

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
14 juillet 2005 (14.07.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/063969 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12N 5/08

(FR). LEMOINE, François [FR/FR]; 1 rue Charles Floquet, F-92120 Montrouge (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/003374

(74) Mandataires : BECKER, Philippe etc.; Becker et Associés, 25 Rue Louis Le Grand, F-75002 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international :
23 décembre 2004 (23.12.2004)

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0315360 24 décembre 2003 (24.12.2003) FR

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : ASSIS-
TANCE PUBLIQUE, HOPITAUX DE PARIS [FR/FR];
3, avenue Victoria, F-75004 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : KLATZ-
MANN, David [FR/FR]; 11, rue du Tage, F-75013 Paris

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHODS FOR THE IDENTIFICATION AND PREPARATION OF REGULATOR/SUPPRESSOR T LYMPHOCYTES, COMPOSITIONS AND USES THEREOF

(54) Titre : METHODES D'IDENTIFICATION ET DE PREPARATION DE LYMPHOCYTES T REGULATEURS/SUPPRESSEURS, COMPOSITIONS ET UTILISATIONS

(57) Abstract: The invention relates to the fields of biology, genetics and medicine. The invention describes methods and compositions enabling (1) the identification of suppressor T cells or lymphocytes (Ts) or the precursors thereof (pTs) for diagnostic and therapeutical purposes and for carrying out genomic and proteomic studies, i.e. for the identification of new markers and/or therapeutical targets for said cells; (2) the production of suppressor T cells or lymphocytes (Ts) or the precursors thereof (pTs) and/or the manipulations thereof in vivo or ex vivo for controlling various pathological conditions, including diseases associated with abnormal activity of effector and/or regulator lymphocytes. The invention relates to the preparation of said compositions based on Ts lymphocytes and pTs and to the use thereof in cell therapies. The compositions or cell populations based on the Ts lymphocytes and pTs obtained according to the invention are particularly suitable for the treatment of tumours, auto-immune diseases, allergies, graft-versus-host disease, graft versus infection effects (GVI) or graft-versus-leukemia effects (GVL), inflammatory diseases, type 1 diabetes, viral, bacterial or parasitic infections, for immune reconstruction or induction of tolerance in the event of transplantation of stem cells, tissue or organs in mammals.

(57) Abrégé : La présente invention concerne les domaines de la biologie, de la génétique et de la médecine. L'invention décrit des méthodes et compositions permettant (1) l'identification de cellules ou lymphocytes T suppresseurs (Ts) ou leurs précurseurs (pTs) à des fins diagnostiques et thérapeutiques et pour la réalisation d'études génomiques et protéomiques, notamment pour l'identification de nouveaux marqueurs et/ou cibles thérapeutiques pour ces cellules ; (2) la production de cellules ou lymphocytes T suppresseurs (Ts) ou leurs précurseurs (pTs) et/ou leurs manipulations in vivo ou ex vivo pour contrôler des conditions pathologiques variées, incluant des maladies associées à une activité anormale des lymphocytes effecteurs et/ou régulateurs. L'invention concerne la préparation de telles compositions à base de lymphocytes Ts et pTs, et leur utilisation dans le cadre de thérapies cellulaires. Les compositions ou populations cellulaires à base de lymphocytes Ts et pTs obtenues dans le cadre de l'invention sont en particulier adaptées au traitement des tumeurs, des maladies auto immunes, des allergies, de la maladie du greffon contre l'hôte, des effets greffe contre infection (GVI) ou greffe contre leucémie (GVL), des maladies inflammatoires, du diabète de type I, des infections virales, bactériennes ou parasitaires, à la reconstitution immunitaire ou à l'induction d'une tolérance en cas de transplantation de cellules souches, tissus ou organe chez un mammifère.



A2

WO 2005/063969



Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

- *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement*

Publiée :

- *sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport*

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

**Méthodes d'identification et de préparation de lymphocytes T
régulateurs/suppresseurs, compositions et utilisations.**

La présente invention concerne les domaines de la biologie, de la génétique et de la médecine. L'invention décrit des méthodes et compositions permettant l'identification, la production et la manipulation ex vivo et in vivo de cellules ou lymphocytes T supprimeurs (Ts, y compris leurs précurseurs pTs), aussi appelés T régulateurs (ou Treg), et l'utilisation desdits lymphocytes supprimeurs pour contrôler des conditions pathologiques variées, incluant des maladies associées à une activité anormale des lymphocytes effecteurs et/ou des T régulateurs/supprimeurs. L'invention concerne la préparation de telles compositions à base de lymphocytes Ts et pTs, et leur utilisation dans le cadre de thérapies cellulaires et/ou géniques. Les compositions ou populations cellulaires à base de lymphocytes Ts et pTs obtenues dans le cadre de l'invention sont en particulier adaptées au traitement de maladies génétique ou acquises, notamment des tumeurs, des maladies auto-immunes, des allergies, de la maladie du greffon contre l'hôte, des effets greffe contre infection (GVI) ou greffe contre leucémie (GVL), des maladies inflammatoires incluant par exemple l'athérosclérose, du diabète, des infections virales, bactériennes ou parasitaires, à la reconstitution immune ou à l'induction d'une tolérance en cas de transplantation de cellules souches, tissus ou organe chez un mammifère.

L'existence dans le système immunitaire de cellules capables d'avoir des fonctions régulatrices/suppressives a été suspectée depuis longtemps. Dans les années 80, de nombreuses publications scientifiques ont montré l'existence d'activités suppressives au sein de la population lymphocytaire T. Cependant, l'impossibilité de caractériser et d'isoler des cellules portant une telle fonction à partir de la population lymphocytaire globale, qui possède par ailleurs de nombreuses autres fonctions incluant notamment celles de fonction effectrice, n'a pas permis de mieux comprendre ce phénomène. À partir de 1995, une sous-population de lymphocytes T CD4⁺ exprimant de façon constitutive le marqueur CD25 a été identifiée chez les rongeurs comme jouant un rôle majeur dans le contrôle des réponses immunes et des maladies auto-immunes. Ces cellules T CD4⁺/CD25⁺ appelées cellules T régulatrices ou suppressives (Ts)

représentent chez la souris environ 5-10 % des cellules T CD4+. Les cellules Ts expriment un récepteur T spécifique pour l'antigène, comme les autres lymphocytes T, mais leur action globale est en partie non-spécifique avec la possibilité de recruter d'autres lymphocytes T suppresseurs additionnels par un phénomène nommé
5 "infectious suppression". Chez l'homme, une population cellulaire régulatrice CD4+/CD25+, qui représente moins de 5 % des cellules T CD4+, a également été décrite.

Plusieurs expériences ont maintenant clairement établi le potentiel thérapeutique des lymphocytes T suppresseurs CD4+/CD25+ dans de nombreuses maladies.

10

Ainsi, les cellules Ts jouent un rôle majeur dans le contrôle des maladies auto-immunes telles que le diabète de type I ou la maladie du greffon contre l'hôte (GVH) induites par les lymphocytes T allogéniques. L'addition de cellules Ts à des greffons contenant des cellules souches hématopoïétiques allogéniques et des lymphocytes T effecteurs peut
15 contrôler la survenue ou l'émergence de la GVH. L'injection de cellules Ts peut réduire la réponse auto-immune dans les polymyosites auto-immunes (non publié). Les cellules Ts jouent aussi un rôle majeur pour l'établissement ou l'induction d'une tolérance lors de la transplantation de tissus ou d'organes et/ou en présence de molécules immunogéniques telles que des transgènes. Les cellules Ts jouent également un rôle
20 important dans la modulation de la réponse aux agents infectieux, et notamment aux bactéries intra-cellulaires et aux virus.

Les cellules Ts jouent un rôle dans plusieurs maladies inflammatoires telles que l'athérosclérose. Dans ce cas, l'absence ou la réduction du nombre de cellules Ts
25 conduit à une accélération du développement de la maladie et à une augmentation de sa sévérité (résultats non publiés).

Il est maintenant bien établi que les cellules Ts empêchent le développement des réponses anti-tumorales effectrices, qui sans cela peuvent aboutir à l'éradication des
30 tumeurs. Chez la souris, la déplétion des cellules Ts aboutit dans de nombreux modèles de cancer à l'éradication des tumeurs par une réponse immunitaire effectrice. Chez l'homme, une corrélation entre évolution défavorable et Ts a été décrite dans plusieurs

pathologies malignes. Les Ts tumorales sont associées à une survie réduite. De plus, la modulation médicamenteuse des Ts améliore les traitements à base de Lymphocytes Infiltrant les Tumeurs.

- 5 Les cellules Ts sont également importantes au cours de la vaccination puisqu'elles peuvent supprimer le développement d'une réponse immune spécifique. De même, la déplétion ou la réduction du nombre de cellules Ts améliore très sensiblement les effets d'une vaccination anti-cancéreuse.
- 10 Finalement, de nombreuses publications font maintenant état de la présence d'un nombre ou d'un pourcentage anormal de cellules Ts qui se manifestent dans le cadre de pathologies variées, et lors de l'évolution d'une maladie donnée.

Tous ces arguments montrent que l'identification, la sélection, l'expansion ou la
15 déplétion des lymphocytes T régulateurs CD4+/CD25+ in vitro ou in vivo représentent un énorme potentiel diagnostic et thérapeutique pour de nombreuses pathologies et en particulier pour les maladies auto-immunes, les maladies inflammatoires, les maladies infectieuses, le cancer et les rejets de greffe.

- 20 La caractérisation des cellules Ts revêt ainsi une importance majeure. Bien que peu d'éléments soient connus concernant l'homéostasie et la régulation de cette population de lymphocytes Ts, il apparaît que le facteur de transcription Foxp3 joue un rôle important dans le développement et le fonctionnement des lymphocytes T suppresseurs CD4+/CD25+. Il n'est pas établi que Foxp3 est exprimé sur toutes les cellules Ts mais
25 l'absence d'expression de Foxp3 chez la souris est corrélée à une perte dramatique des fonctions des cellules Ts, tandis que l'expression forcée de Foxp3 dans des lymphocytes T effecteurs transforme ces derniers en cellules Ts.

- Bien que les marqueurs CD4 et CD25 caractérisent une population de cellules qui
30 contient les lymphocytes T suppresseurs, il apparaît en fait que les fonctions suppressives ne sont pas entièrement portées par les cellules CD4+/CD25+ et surtout que toutes les cellules CD4+/CD25+ ne sont pas suppressives. En effet, CD25 est un

marqueur également exprimé par les cellules T effectrices activées. L'identification et la purification des cellules Ts sur la base d'un tel marqueur est un problème majeur puisqu'elles présentent le risque d'identifier et de purifier en réalité des cellules T effectrices activées. Dans le cadre d'une pathologie immunologique donnée, les lymphocytes T activés exprimant CD4 et CD25 ont de grande probabilité de contenir
5 justement les T effecteurs contre lesquels une intervention thérapeutique est souhaitable. Ainsi l'utilisation de CD4 et CD25 dans un cadre diagnostique (identification) ne serait pas fiable, et dans un cadre thérapeutique (purification, injection) ferait encourir le risque d'être inefficace voire de majorer la pathologie.

10

Le meilleur marqueur actuellement connu comme susceptible de différencier les cellules Ts des lymphocytes T effecteurs activés est l'expression du facteur de transcription Foxp3. Cependant, ce facteur de transcription intra-cellulaire n'est pas utilisable dans le cadre de simples méthodes d'identification et de purification
15 immunophénotypiques. D'autres marqueurs tels que CD62L permettent de mieux caractériser les cellules Ts mais ils sont loin de permettre une identification parfaite. De plus, plusieurs publications ont montré qu'il existait des activités suppressives au sein de la population CD4+/CD25- de même que dans certaines cellules CD8+. Il apparaît donc que l'utilisation diagnostique et thérapeutique des cellules Ts est clairement
20 dépendante de leur identification propre et que les connaissances actuelles n'ont jusqu'à ce jour décrit aucun marqueur spécifique des lymphocytes T suppresseurs.

En outre, si la différenciation de certains lymphocytes Ts semble réalisée dans le thymus (ils sont souvent appelés Ts « naturels »), d'autres lymphocytes Ts pourraient être
25 générés à la périphérie et rien n'est connu sur le développement ontogénique des Ts à partir des progéniteurs T.

La présente invention offre pour la première fois la possibilité d'identifier, d'isoler, d'analyser (transcriptome, protéome...) et de manipuler (culture, activation, déplétion,
30 modifications génétiques...) des populations de cellules T suppressives, en particulier humaines, et notamment (i) des populations de précurseurs des Ts, et (ii) des populations de Ts pures parmi les cellules CD4+ et CD8+. La présente invention

découle de la découverte que la molécule CD90, encore appelée THY-1, représente un marqueur caractéristique des cellules Ts humaines CD4⁺ et/ou CD8⁺, et de leurs précurseurs et peut être utilisée efficacement pour identifier ces populations cellulaires.

5 L'antigène THY-1 (Seki et al., 1985 ; Planelles et al., 1995) correspond à une glycoprotéine de surface bien caractérisée et ancrée à la membrane par un pont phosphatidyl-inositol. Cette protéine appartient à la superfamille des immunoglobulines et comprend environ 140 acides aminés (25-30 kDa). Cet antigène a été tout d'abord
10 identifié comme un marqueur de différenciation exprimé dans le thymus et le cerveau de souris. Chez l'homme, THY-1 est exprimé sur un faible pourcentage de thymocytes fœtaux, sur les progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ immatures et sur moins de 1 % des lymphocytes CD3⁺ présents dans la circulation périphérique. THY-1 est aussi exprimé sur les cellules mésenchymateuses, les cellules endothéliales ainsi que sur plusieurs lignées cellulaires continues. La fonction de THY-1 n'est pas connue.

15

Chez la souris, THY-1 est exprimé au niveau du thymus sur les progéniteurs et précurseurs T. Il est également exprimé sur des cellules régulatrices (Mukasa et al., Clin. Exp. Immunol. 96 (1994) 138 ; Torre-Amione et al., Cell. Immunol. 124 (1989) 50 ; Sakatsume et al., Int. Immunol. 3 (1991) 377) ainsi que sur l'ensemble des
20 lymphocytes T circulants. De ce fait, il ne peut constituer un marqueur discriminant d'un type cellulaire particulier. Par ailleurs, deux isoformes Thy-1.1 et Thy-1.2 ont été décrites chez la souris.

Les inventeurs ont maintenant découvert que, de manière surprenante, l'expression de la
25 molécule THY-1 chez l'homme est très étroitement corrélée à l'activité Ts, et que la molécule THY-1 constitue un marqueur spécifique de lymphocytes T suppresseurs, permettant notamment l'identification, la sélection, l'expansion ou la déplétion in vitro ou in vivo de précurseurs des Ts et/ou de populations Ts pures parmi les lymphocytes CD4⁺ ou CD8⁺.

30

Un premier aspect de la présente invention concerne donc une méthode d'obtention, de préparation ou de production de lymphocytes T suppresseurs (et/ou leurs

précurseurs), comprenant une étape de sélection, de séparation, et/ou d'isolement des lymphocytes T exprimant la molécule THY-1. Cette étape peut être réalisée à partir de tous échantillons biologiques comprenant des lymphocytes.

- 5 Un objet plus particulier de la présente invention concerne une méthode d'obtention, de préparation ou de production de lymphocytes T suppresseurs (et/ou leurs précurseurs) comprenant :
- (a) l'obtention d'une population de cellules de mammifère comprenant des lymphocytes T, et
 - 10 (b) la récupération des lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1.

- Les lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1 sont de préférence sélectionnés, séparés, isolés, récupérés ou éliminés au moyen d'un ligand spécifique de THY-1. Avantageusement, le ligand est choisi parmi un anticorps ou un fragment d'anticorps.
- 15 Le ligand peut être par exemple immobilisé sur un support ou placé en solution. Un tel ligand est plus amplement défini dans la description qui suit de l'invention. En outre, l'étape (b) peut être précédée et/ou suivie d'une étape d'amplification des lymphocytes T et/ou d'une étape de purification de sous population(s) de lymphocytes, comme par exemple les lymphocytes CD4⁺ ou CD8⁺, voire de lymphocytes spécifiques d'un
- 20 antigène donné.

- Un autre objet de l'invention concerne une méthode d'identification et/ou de quantification de lymphocytes T suppresseurs (et/ou leurs précurseurs) dans une population cellulaire, comprenant l'exposition de ladite population cellulaire à un ligand
- 25 spécifique de THY-1 et la détermination et/ou la quantification de la formation d'un complexe entre le ligand et les cellules, la formation de tels complexes indiquant la présence et/ou la quantité de lymphocytes T suppresseurs (et/ou leur précurseurs) au sein de la population cellulaire. Les cellules liant le ligand peuvent être séparées des cellules ne liant pas le ligand.

30

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un ligand spécifique de l'antigène THY-1 pour enrichir ou éliminer ex vivo les lymphocytes T suppresseurs (et/ou leurs

précurseurs) d'une population cellulaire. L'antigène THY-1 peut lui-même être utilisé comme marqueur de sélection des lymphocytes Ts ou pTs au sein d'une population cellulaire. Un autre objet de l'invention réside dans une méthode de diagnostic d'un patient, comprenant la détermination de la présence, du nombre ou de l'état d'activité de
5 cellules Ts chez ce patient en utilisant un ligand spécifique de THY-1. Un tel diagnostic peut être réalisé in vitro, ex vivo ou in vivo, et permettre la détection d'un état pathologique lié à l'activité du système immunitaire, ou le suivi de l'efficacité d'un traitement, ou la sélection d'un patient en vue de l'inclure dans un programme thérapeutique particulier.

10

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un ligand spécifique de l'antigène THY-1 pour sélectionner, identifier, trier ou préparer (in vitro ou ex vivo) des lymphocytes Ts ou pTs .

L'invention concerne en outre les lymphocytes T suppresseurs (et/ou leur précurseurs)
15 exprimant l'antigène THY-1 susceptibles d'être obtenus grâce à une méthode selon l'invention.

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un ligand spécifique de l'antigène THY-1 pour préparer une composition diagnostique destinée à sélectionner,
20 identifier ou quantifier in vivo des lymphocytes T suppresseurs (y compris leurs précurseurs).

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un ligand spécifique de l'antigène THY-1 pour préparer une composition thérapeutique destinée à modifier, stimuler ou
25 supprimer in vivo des lymphocytes T suppresseurs. A cet égard, un objet particulier de l'invention concerne l'utilisation d'un ligand spécifique de THY-1 pour enrichir ou éliminer ex vivo ou in vivo les lymphocytes T suppresseurs (y compris leurs précurseurs) d'une population cellulaire.

30 Un autre aspect de l'invention réside dans l'utilisation de l'antigène THY-1 comme marqueur de sélection pour enrichir ou éliminer, in vivo, in vitro ou ex vivo, les lymphocytes Ts ou pTs au sein d'une population cellulaire.

L'invention concerne en outre les lymphocytes T suppresseurs (y compris leurs précurseurs) exprimant l'antigène THY-1 susceptibles d'être obtenus par une méthode telle que définie précédemment, ainsi qu'une population de cellules enrichie en cellules
5 Ts ou pTs, dans laquelle au moins 30%, de préférence au moins 50%, de manière encore plus préférée au moins 65% des cellules T expriment l'antigène THY-1. Des compositions ou populations cellulaires particulièrement préférées selon la présente invention comprennent au moins 75%, de préférence au moins 80% de cellules Ts ou pTs exprimant THY-1, plus préférentiellement au moins 85, 90 ou 95%.

10

L'invention concerne encore un lymphocyte T humain isolé, caractérisé en ce qu'il présente une activité suppressive et en ce qu'il exprime les marqueurs CD8 ou CD4 et THY-1, ainsi qu'une population de cellules comprenant des cellules T suppressives CD8+THY-1+ ou CD4+THY-1+, de préférence une population comprenant au moins,
15 50, 60, 70, 80, 85, 90 ou 95% de cellules T CD8+THY-1+. De telles cellules peuvent, en partie exprimer également l'antigène CD25.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, les lymphocytes T présents dans la population de cellules de mammifère ou les lymphocytes Ts ou pTs (porteurs du
20 marqueur THY-1) peuvent être modifiés génétiquement de manière à exprimer des produits biologiques d'intérêt, permettant notamment d'améliorer leur efficacité et/ou leur sécurité d'utilisation.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant des
25 cellules ou populations cellulaires telles que définies précédemment, typiquement en association avec un véhicule ou excipient acceptable sur le plan pharmaceutique.

Un autre objet particulier de l'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant des cellules T suppresseurs (et/ou leurs précurseurs) humaines amplifiées
30 ex vivo et un adjuvant ou un milieu acceptable sur le plan pharmaceutique, lesdites cellules amplifiées étant enrichies en cellules exprimant l'antigène THY-1 et, éventuellement, en cellules spécifiques d'un antigène particulier, tels que des allergènes,

des auto-antigènes, des allo-antigènes ou des antigènes d'agents infectieux. De manière préférée, l'antigène est impliqué dans ou spécifique d'une condition pathologique choisie parmi une maladie immunitaire, en particulier les maladies auto-immunes, les maladies inflammatoires, la maladie du greffon contre l'hôte, une allergie et le rejet
5 d'une greffe.

L'invention concerne également la préparation d'une composition constituée d'au moins un tel lymphocyte T suppresseur, d'une population enrichie en cellules Ts et/ou pTs telle que définie ci-dessus ou au contraire d'une population déplétée en cellules Ts
10 et/ou pTs et d'un adjuvant ou d'un milieu acceptable sur le plan pharmaceutique ainsi que la composition elle-même destinée à la mise en œuvre d'une méthode thérapeutique.

Un objet particulier de l'invention concerne ainsi également une méthode de production
15 d'une composition pharmaceutique, comprenant :

- (a) l'obtention d'un échantillon biologique comprenant des lymphocytes T,
- (b) la sélection des lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1 au sein de cet échantillon biologique, et
- (c) le conditionnement desdits lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1 dans un
20 adjuvant ou un milieu acceptable sur le plan pharmaceutique.

Un autre objet particulier de l'invention concerne ainsi également une méthode de production d'une composition pharmaceutique, comprenant :

- (a) l'obtention d'un échantillon biologique comprenant des lymphocytes T,
- 25 (b) la déplétion des lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1 au sein de cet échantillon biologique, et
- (c) le conditionnement desdits lymphocytes T obtenus n'exprimant pas l'antigène THY-1 dans un adjuvant ou un milieu acceptable sur le plan pharmaceutique.

30 L'invention concerne par ailleurs un kit pour isoler ou caractériser des cellules Ts comprenant un ligand spécifique de THY-1, éventuellement disposé sur un support ou placé en solution ainsi que, éventuellement, des réactifs pour la détection du ligand. Le

ligand est typiquement disposé dans un conteneur, tel qu'une plaque, seringue, tube, pipette, flacon, etc. Un tel kit peut en outre être utilisé pour diagnostiquer la présence de telles cellules Ts et pTs à partir d'un échantillon biologique prélevé sur l'un individu à tester ou directement in vivo.

5

L'invention concerne par ailleurs un kit ou une composition pour éliminer les cellules Ts et pTs in vivo, in vitro ou ex vivo, comprenant un ligand spécifique de THY-1, éventuellement placé en solution ou sur un support, et couplé à un produit toxique (radioactif, toxines...). L'invention vise également l'utilisation d'un ligand de Thy-1
10 pour cibler spécifiquement un vecteur viral ou non viral dans les Ts et pTs afin d'exprimer des gènes.

L'invention concerne par ailleurs un kit ou une composition pour activer les cellules Ts et pTs in vivo, ex vivo ou in vitro, comprenant un ligand spécifique de THY-1,
15 éventuellement placé en solution ou sur un support, couplé à un produit capable d'activer les lymphocytes T (par exemple une cytokine, telle que IL2, IL7, IL 10, IL15). L'invention vise également l'utilisation d'un ligand de THY-1 pour cibler spécifiquement un vecteur viral ou non viral dans les Ts afin d'exprimer des gènes activateurs ou tous gènes thérapeutiques.

20

Les cellules Ts, les compositions constituées de cellules Ts et pTs isolées ou amplifiées et les compositions enrichies en cellules Ts et pTs obtenues dans le cadre de la présente invention peuvent être avantageusement utilisées dans le cadre d'applications expérimentales ou thérapeutiques. Les cellules utilisées dans le cadre de la présente
25 invention sont des cellules de mammifère, typiquement humaines. L'invention est également utilisable notamment chez les primates, et concerne donc également des cellules T suppresseurs de primates, notamment de singe.

Un objet particulier de l'invention a ainsi également trait à des méthodes d'analyse et
30 d'obtention de séquences génétiques spécifiquement exprimées dans des lymphocytes T suppresseurs (ou leurs précurseurs), une méthode comprenant l'isolement de l'ARN d'une population de lymphocytes T exprimant l'antigène Thy-1, la comparaison dudit

ARN à l'ARN extrait d'une population de lymphocytes T non suppresseurs et la récupération de l'ARN spécifique des lymphocytes T suppresseurs. L'invention concerne également une méthode telle que décrite précédemment comprenant en outre la fabrication d'une sonde à partir de l'ARN spécifique des lymphocytes T suppresseurs (ou leur précurseurs) et le criblage d'une population d'acides nucléiques destinés à être hybridés à ladite sonde. Une méthode correspond également à l'analyse du transcriptome par hybridation d'ARN sur des biopuces afin d'établir des profils d'expression. Ces différentes méthodes aboutissent à caractériser l'expression des gènes importants pour la différenciation, la maturation, la régulation et la fonction des Ts et pTs, permettant ainsi de définir de nouveaux marqueurs et/ou cibles thérapeutiques potentielles.

Un objet particulier de l'invention a ainsi trait à une méthode d'obtention de protéines spécifiquement exprimées dans des lymphocytes T suppresseurs (ou leurs précurseurs). Une méthode comprend l'isolement des protéines d'une population de lymphocytes T exprimant l'antigène Thy-1, la comparaison de ces protéines à celles extraites d'une population de lymphocytes T non suppresseurs. Ces différentes méthodes aboutissent à caractériser l'expression de protéines importantes pour la différenciation, la maturation, la régulation et la fonction des Ts et pTs, permettant de définir ainsi de nouveaux marqueurs et/ou cibles thérapeutiques potentielles.

Un objet particulier de l'invention a ainsi trait à une méthode d'identification de nouvelles molécules spécifiquement exprimées dans des lymphocytes T suppresseurs (ou leurs précurseurs) par immunisation à l'aide de lymphocytes Ts (ou pTs) exprimant l'antigène Thy-1, ou de fractions cellulaires ou protéiques de ces mêmes cellules.

Un autre objet particulier de l'invention concerne en outre l'utilisation, dans un cadre thérapeutique, des cellules Ts (ou pTs), des compositions constituées de cellules Ts (ou pTs) isolées ou amplifiées et des compositions enrichies en cellules Ts (ou pTs) obtenues dans le cadre de la présente invention, par exemple pour traiter de nombreux sujets, par exemple des patients humains souffrant de ou présentant un risque de développer une maladie immunitaire, en particulier une maladie provoquée par une

réponse T anormale. Les cellules Ts (ou pTs) sont ainsi adaptées au traitement de diverses pathologies ou affections provoquées par un désordre affectant les lymphocytes T et en particulier une tumeur, une maladie auto-immune, une allergie, la maladie du greffon contre l'hôte, une maladie inflammatoire, un diabète de type I, une infection virale ou bactérienne, etc. Elles favorisent également la reconstitution immunitaire et l'induction d'une tolérance en cas de greffe ou de transplantation de cellules souches, tissus ou organe chez un mammifère. C'est le cas, par exemple suite à une greffe de moelle osseuse ou de cellules souches hématopoïétiques. Le traitement peut être préventif ou curatif. Il peut également être combiné à d'autres traitements.

Cellules T suppressseurs (ou leur précurseurs) humaines

Dans le contexte de la présente invention, le terme lymphocytes (ou cellules) T suppressseurs désigne une population de cellules T qui sont caractérisées par leur capacité à supprimer ou diminuer les réactions immunitaires médiées par les cellules T effectrices, telles que les cellules T CD4⁺ ou CD8⁺. Ce terme inclut les cellules Ts conventionnelles, qui expriment fortement le marqueur CD25, de même que leurs précurseurs, désignés pTs, qui sont doués d'activité suppressive et peuvent donner naissance, en culture, aux cellules Ts conventionnelles. L'invention démontre en effet l'existence d'une population de cellules T suppressives, désignées pTs, exprimant les marqueurs THY-1 et CD25, douée de propriété suppressive, et capable de donner naissance en culture aux cellules Ts conventionnelles. Le terme lymphocytes T suppressseurs inclut également des lymphocytes Ts issus de populations lymphocytaires totales (ou CD25⁻), de type CD4⁺ ou CD8⁺, exprimant THY-1.

Comme indiqué dans l'introduction de la présente demande, bien que les marqueurs CD4 et CD25 caractérisent les lymphocytes T suppressseurs (ou leurs précurseurs) sur un plan immunophénotypique, il apparaît en fait que les fonctions suppressives ne sont pas entièrement portées par les cellules CD4⁺/CD25⁺ et que toutes les cellules CD4⁺/CD25⁺ ne sont pas suppressives. CD25 est en effet un marqueur également exprimé par les cellules T effectrices activées. La présente invention découle de la mise en évidence que la molécule antigénique THY-1 représente un marqueur caractéristique

des cellules Ts et pTs humaines et peut être utilisée efficacement pour identifier cette population cellulaire.

La présente invention concerne ainsi, comme indiqué précédemment, une méthode
5 d'obtention, de préparation, de sélection ou de production de lymphocytes T
suppresseurs (y compris leurs précurseurs) humains comprenant :

- (a) l'obtention d'une population de cellules d'origine humaine comprenant des lymphocytes T, et
- (b) la récupération des lymphocytes T exprimant THY-1.

10

La population cellulaire peut être obtenue, dans le cadre de l'étape (a), à partir d'échantillons biologiques comprenant des lymphocytes, notamment d'échantillons d'un tissu choisi parmi la moelle osseuse, la rate, le foie, le thymus, du sang ayant ou non été préalablement enrichi en lymphocytes T, du sang de cordon ombilical, du sang
15 périphérique fœtal, de nouveaux-nés ou d'adulte, du plasma, d'un ganglion lymphatique, d'une tumeur, d'un site inflammatoire, d'un organe transplanté ou d'une culture de cellules établie avec l'un ou l'autre desdits tissus. Les lymphocytes sont typiquement isolés ou collectés à partir du sang périphérique.

20 Les lymphocytes T exprimant THY-1 peuvent être récupérés, sélectionnés, isolés, déplétés ou triés, notamment lors de l'étape (b), à l'aide de tous ligands spécifiques de THY-1, c'est-à-dire typiquement de toutes molécules capables de lier sélectivement Thy-1 à la surface d'une cellule. Le ligand est de préférence choisi parmi un anticorps, de préférence un anticorps anti-THY-1, un analogue ou un fragment d'un tel anticorps.

25

THY-1 est une molécule dépourvue de domaine intra-cytoplasmique qui interagit avec la membrane cellulaire par l'intermédiaire d'un glycoposphatidylinositol (GPI) qui s'attache à la membrane par son extrémité C-terminale. La séquence de Thy-1 a été déterminée et est accessible dans la littérature, comme par exemple la séquence
30 nucléotidique (n° NM 006288 (gi : 199 233 61)) et la séquence en acides aminés (n° NP 006279 (gi : 199 233 62)) de la protéine humaine. Un ligand spécifique selon l'invention est de préférence une molécule capable de lier sélectivement un polypeptide

comprenant tout ou partie de la séquence de la protéine Thy-1 humaine, de préférence une molécule comprenant un épitope de la protéine Thy-1 humaine. De tels ligands sont naturellement choisis parmi les molécules reconnues et/ou capables d'interagir avec la partie extra-cellulaire de THY-1.

5

Un ligand préféré de THY-1, utilisable dans le cadre de la présente invention, est un anticorps anti-THY-1 (c'est-à-dire un anticorps spécifique de THY-1). L'anticorps peut être polyclonal ou monoclonal. Il peut également s'agir de fragments et dérivés d'un fragment ou dérivé d'anticorps présentant substantiellement la même spécificité
10 antigénique, en particulier des fragments d'anticorps (e.g., Fab, Fab'2, CDRs), d'anticorps humanisés, d'anticorps humains, d'anticorps poly-fonctionnels, monocaténaires (ScFv), ou multimériques (couplage C4bp par exemple), etc. Les anticorps, et donc les sites de reconnaissance de la molécule THY-1 utilisables pour générer un ligand spécifique, peuvent être produits à l'aide de méthodes
15 conventionnelles, comprenant l'immunisation d'un animal non-humain avec un polypeptide THY-1 ou un fragment de celui-ci comportant un épitope, et la récupération de son sérum (polyclonal) ou de cellules spléniques (de manière à produire des hybridomes par fusion avec des lignées cellulaires appropriées). Diverses méthodes de production d'anticorps polyclonaux à partir d'espèces variées ont été décrites dans l'art
20 antérieur. Typiquement, l'antigène est combiné avec un adjuvant (par exemple l'adjuvant de Freund) et administré à un animal, par exemple par injection sous-cutanée. Des injections répétées peuvent être réalisées. Les échantillons sanguins sont collectés et l'immunoglobuline ou le sérum sont séparés.

25 Les méthodes classiques de production d'anticorps monoclonaux comprennent l'immunisation d'un animal non-humain avec un antigène, suivie de la récupération des cellules spléniques qui sont ensuite fusionnées avec des cellules immortalisées, telles que des cellules de myélome. Les hybridomes résultant produisent des anticorps monoclonaux et peuvent être sélectionnés par dilutions limites de manière à isoler les
30 clones individuels. Les fragments Fab ou F(ab')₂ peuvent être produits par digestion à l'aide d'une protéase selon les techniques conventionnelles.

Les anticorps préférés sont des anticorps spécifiques de la protéine THY-1, c'est-à-dire ayant une affinité supérieure pour cette protéine que pour d'autres antigènes, même si une liaison non-spécifique ou moins affine ne peut être exclue. Le terme « spécifique » ou « sélectif » indique notamment que la liaison du ligand à la protéine THY-1 peut être
5 discriminée de la liaison éventuelle du ligand à d'autres molécules.

Les cellules Ts et pTs peuvent ainsi être isolées, dans le cadre de l'étape (b), par mise en contact de la population cellulaire avec des ligands spécifiques, tels que ceux définis précédemment. Des exemples particuliers de ligands spécifiques selon l'invention sont
10 notamment les anticorps monoclonaux produits par les hybridomes K17 (ATCC n° HB-8553), les clones 5E10, F15-42-1, Thy-1/310, FIB1 (clone AS02), ainsi que tous fragments ou dérivés de ces anticorps.

D'autres ligands spécifiques selon l'invention sont par exemple des ligands artificiels, présentant une affinité particulière pour THY-1. De tels ligands peuvent être de nature
15 variée, comme des acides nucléiques (par exemple des aptamères) ou des molécules chimiques de synthèse. De telles molécules peuvent être générées par exemple sur la base des séquences des sites de reconnaissance de la molécule THY-1 par les anticorps spécifiques définis précédemment.

20 Les cellules Ts et pTs peuvent ainsi être isolées, dans le cadre de l'étape (b), par mise en contact de la population cellulaire avec un ou plusieurs ligands spécifiques, tels que ceux définis précédemment.

25 Il est possible d'utiliser, dans le cadre de la présente invention, un ou plusieurs ligands spécifiques de THY-1, éventuellement en combinaison avec d'autres ligands spécifiques d'autres marqueurs de cellules T, comme CD25 notamment. Ainsi, dans un mode particulier de réalisation, l'invention utilise une combinaison d'un ligand spécifique de THY-1 et d'un ligand spécifique de CD25. Le second ligand peut être spécifique de tout
30 autre marqueur de cellules T, notamment de cellules T suppressors, par exemple des marqueurs identifiés par les techniques de génomique et protéomique décrites dans la présente demande.

Le (ou les) ligand(s) peut (peuvent) être immobilisé(s) sur un support, par exemple une colonne ou une bille (notamment une bille magnétique), ou placé(s) en solution. En outre, ou en variante, le ligand peut éventuellement être marqué. Le marquage peut être
5 réalisé à l'aide d'un marqueur de détection fluorescent, radioactif, luminescent, phosphorescent, chimique ou enzymatique. Le marqueur de détection est de préférence choisi parmi la fluorescéine, le rouge Texas, la rhodamine, la phycoérythrine, l'allophycocyanine, la biotine et la streptavidine, la Cyanine.

10 Les complexes formés par le ligand et les cellules marquées peuvent ensuite être utilisés pour visualiser, détecter, quantifier, trier, isoler et/ou dépler les cellules, selon des techniques variées et connues en soi de l'homme du métier. Ainsi, les cellules peuvent être récupérées, sélectionnées, triées, séparées, isolées, déplétées par exemple par une méthode choisie parmi la cytométrie de flux, la chromatographie d'affinité, le FACS
15 (fluorescent activated cell sorting« Fluorescent Activated Cell Sorting »), le MACS (magnetic bead cell sorting« Magnetic bead Cell Sorting »), le D/MACS (double magnetic bead cell sorting), une chromatographie d'affinité« Double Magnetic bead Cell Sorting »), une méthode de sélection sur surface solide (« panning »), un test ELISA, un test RIA, etc.

20

La procédure MACS est décrite en détails par Miltenyi et al., "High Gradient Magnetic Cell Separation with MACS," Cytometry 11: 231-238 (1990). Afin de récupérer les cellules, les cellules marquées avec des billes magnétiques traversent une colonne de séparation paramagnétique. La colonne de séparation est placée à proximité
25 d'un aimant, créant ainsi un champ magnétique à l'intérieur de la colonne. Les cellules marquées magnétiquement sont piégées dans la colonne, les autres traversent cette dernière. Les cellules piégées à l'intérieur de la colonne sont ensuite éluées.

Dans la procédure D/MACS, un échantillon de cellules est marqué à l'aide de billes
30 magnétiques comprenant des anticorps, et les cellules sont récoltées ou triées par application d'un champ magnétique.

Selon un mode de réalisation préféré, les cellules (par exemple du sang périphérique) sont incubées de façon séquentielle avec des quantités saturantes d'anticorps anti-THY-1 fonctionnalisés (e.g., marqué à la biotine) et avec un support solide (par exemple des microbilles) fonctionnalisés (e.g., recouvert de streptavidine). Les cellules sont ensuite purifiées par récupération du support, e.g., par séparation magnétique des cellules. De manière à augmenter la purification des cellules, les cellules de la fraction positive peuvent être ultérieurement séparées sur une autre colonne. La purification est généralement réalisée dans un tampon de sels phosphate, bien que d'autres milieux adaptés puissent être utilisés.

10

Les cellules peuvent être cultivées ou maintenues dans tous tampons ou milieux adaptés, telle qu'une solution saline, un tampon, un milieu de culture, en particulier le DMEM, le RPMI etc. Elles peuvent être congelées ou maintenues dans une situation froide. Elles peuvent être formulées dans tous dispositifs ou appareils appropriés, tel qu'un tube, une flasque, une ampoule, un plat, une seringue, une poche, etc., de préférence dans des conditions stériles adaptées à une utilisation pharmaceutique.

15

20

Comme indiqué précédemment, l'étape (b) de la méthode décrite ci-dessus peut avantageusement être précédée et/ou suivie d'une étape de purification d'une sous population de lymphocytes T (CD4+ et/ou CD8+ par exemple) et/ou d'une étape d'amplification des lymphocytes (qui peut être réalisée ex vivo ou in vitro.).

25

30

L'amplification peut être obtenue par activation des lymphocytes. Cette activation peut être non spécifique (obtenue par exemple par des anticorps anti-CD3 et/ou anti-CD28, avec ou en présence d'une interleukine, par exemple l'IL2) ou spécifique (obtenue par des antigènes ou allo-antigènes présentés de façon adéquate aux lymphocytes Ts ou pTs, par exemple par des cellules présentatrices de l'antigène (cellules dendritiques, lymphocytes B, monocytes macrophages, cellules génétiquement modifiées capables de présenter l'antigène et d'activer les lymphocytes), des exosomes, des dexosomes, des structures artificielles, etc.). L'étape d'amplification permet d'augmenter le nombre de lymphocytes T présents au sein de la population lymphocytaire T de départ (qui comprend des lymphocytes T effecteurs et des lymphocytes T suppresseurs) avant de

procéder à la sélection des lymphocytes Ts et pTs, et/ou d'augmenter le nombre de lymphocytes Ts et pTs après avoir sélectionné les lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1. Il est également possible de procéder à deux étapes d'amplification, l'une concernant la population lymphocytaire T générale présente dans la population de
5 cellules de mammifère, l'autre concernant la population de lymphocyte Ts et pTs.

Dans un mode de mise en œuvre préféré, l'étape d'amplification est réalisée dans des conditions qui favorisent les Ts (ou pTs), permettant ainsi leur enrichissement. Ainsi, la présente invention montre que la culture en absence de N-acetyl cystéine favorise la
10 prolifération des Ts (figure 1). Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, les cellules sont amplifiées par culture dans un milieu dépourvu de N-acetyl cystéine. D'autre part, l'utilisation de certaines populations de cellules présentatrices d'antigène naturelles ou modifiées (notamment génétiquement) peut favoriser la prolifération des Ts (ou pTs). Ainsi, les exemples montrent que les cellules dendritiques dérivées de
15 progéniteurs hématopoïétiques CD34+ et ayant un phénotype de type DC interstitielles favorisent la prolifération des Ts (ou pTs) (Figure 2). Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, les cellules sont amplifiées par culture en présence de cellules dendritiques, notamment de cellules dendritiques interstitielles.

20 La population obtenue à l'issue de l'étape (a) peut également être enrichie en cellules T appartenant à la population générale des cellules T, i.e., comprenant des lymphocytes T effecteurs et des lymphocytes T suppresseurs ou leurs précurseurs.

La population de l'étape (a) peut ainsi être enrichie en cellules T, éventuellement en une ou des sous-populations spécifiques de lymphocytes (par exemple CD4+ et/ou CD8+).
25 Elle peut également être débarrassée de certaines sous-populations de lymphocytes, le cas échéant. La population obtenue à l'issue de l'étape (a) puis, éventuellement amplifiée et/ou triée, comprend ainsi de préférence au moins 30%, de préférence au moins 50%, de manière encore plus préférée au moins 65% de cellules T. Des compositions enrichies en cellules T particulièrement préférées susceptibles d'être
30 utilisées dans le cadre de l'étape (b) comprennent au moins 75%, de préférence au moins 80% de cellules T.

La population de lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1 peut également être amplifiée. Il est par ailleurs possible, comme indiqué ci-dessus, de procéder à deux étapes d'amplification, l'une concernant la population lymphocytaire T générale, l'autre concernant la population de lymphocyte Ts ou pTs.

5

Un objet particulier de la présente invention concerne ainsi une méthode d'obtention de lymphocytes T suppresseurs (et/ou leurs précurseurs) comprenant :

(a) l'obtention d'une population de cellules de mammifère comprenant des lymphocytes T,

10

(a') l'amplification des lymphocytes T au sein de ladite population de cellules, et

(b) la récupération des lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1.

Un autre objet particulier de la présente invention concerne une méthode d'obtention de lymphocytes T suppresseurs (et/ou leurs précurseurs) comprenant :

15

(a) l'obtention d'une population de cellules de mammifère comprenant des lymphocytes T,

(b) la récupération des lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1, et

(b') l'amplification desdits lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1.

20

L'amplification cellulaire des lymphocytes appartenant à la population générale des lymphocytes T (cellules T effectrices, cellules Ts et pTs) est de préférence réalisée par culture des cellules en présence d'une cytokine et éventuellement d'un agent de stimulation. Dans le cas des lymphocytes exprimant l'antigène THY-1 (lymphocytes Ts et pTs), la culture est maintenue pendant une période suffisante pour obtenir l'amplification de ladite population cellulaire au sein des populations lymphocytaires T CD4+ et/ou CD8+. L'activation implique généralement la culture en présence d'une cytokine, telle que par exemple, l'interleukine-2 (IL-2), l'interleukine-7 (IL-7), l'interleukine-10 (IL-10) ou l'interleukine-15 (IL-15), de préférence d'origine humaine. L'agent de stimulation peut être une cellule présentatrice d'antigène (« CPA »), i.e., toute cellule présentatrice d'antigènes ou toute cellule favorisant l'activation des cellules T, en particulier des cellules Ts. Les CPA sont de préférence irradiées avant leur utilisation afin d'éviter leur amplification. Les CPA peuvent être des cellules

30

isolées d'un donneur ou du patient lui-même. Elles peuvent être choisies pour produire des cellules Ts et pTs présentant un profil d'activité choisi. Des exemples caractéristiques de telles CPA incluent les cellules mononucléaires du sang périphérique, des cellules dendritiques, des splénocytes, des cellules du sang de cordon ombilical, des échantillons de tissu ou d'organe, etc. D'autres agents de stimulation des cellules Ts et pTs adaptés incluent les polymères MHC, les lectines (telles que PHA), les anticorps (tels que les anticorps anti-CD3 et/ou anti-CD28) ou des fragments de ces derniers, les auto-antigènes (incluant les tissus, cellules, fragments cellulaires ou débris, les polypeptides ou peptides purifiés, etc., de préférence en combinaison avec les CPA), etc.

Selon l'utilisation envisagée, les cellules Ts et pTs peuvent être amplifiées de différentes façons, qu'elles soient antigènes spécifiques ou non. En particulier, pour certaines utilisations, des quantités élevées du répertoire complet des cellules T sont, de préférence, utilisées (e.g., injectées). Cette technique est, en particulier, adaptée aux patients qui présentent un déficit global (quantitatif ou fonctionnel) en cellules Ts et pTs. Dans de telles indications, les cellules Ts et pTs sont de préférence amplifiées par exemple, à l'aide de cellules CPA autologues et PHA ou d'anticorps anti-CD3 et/ou anti-CD25 (ou de tout autre activateur de cellules T ou Ts) en présence de cytokines de nature identique ou différente.

Généralement, la spécificité des cellules Ts et pTs est importante à prendre en compte. En effet, bien qu'il soit possible d'utiliser des cellules Ts non-spécifiques pour contrôler des réponses immunes spécifiques, l'utilisation de Ts spécifiques apparaît plus efficace. Ainsi, les lymphocytes Ts et pTs, chez l'homme et chez la souris, peuvent être cultivés et amplifiés in vitro en présence d'un milieu de culture contenant de l'interleukine 2, des anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Des lymphocytes Ts et pTs spécifiques peuvent être aussi isolés, générés par exemple par stimulation en présence de cellules présentatrices d'antigènes allogéniques, suivie d'une culture par interleukine 2. Selon un autre mode de réalisation, une amplification plus spécifique peut être envisagée, en particulier lorsqu'une suppression de cellules T effectrices spécifiques est souhaitée, comme dans le cadre des maladies auto-immunes, des allergies, des rejets de greffe, de

la GVHD, etc. Dans de telles indications, les cellules sont de préférence amplifiées en présence de CPA présentant des antigènes particuliers, par exemple allogéniques ou d'origine infectieuse, afin de favoriser l'amplification des cellules Ts préférentiellement actives à l'encontre de cellules T effectrices pathogènes. Les antigènes sont présentés
5 sous forme peptidiques ou après transfert d'ARN ou d'ADN.

Pour traiter les maladies auto-immunes, les cellules Ts et pTs proviennent de préférence du patient et sont stimulées à l'aide de CPA autologues et d'auto-antigènes provenant du tissu cible, en présence de cytokines. Les auto-antigènes peuvent être des tissus,
10 cellules, fragments cellulaires, protéines purifiées, peptides, acides nucléiques, etc.

Pour le traitement des allogreffes ou xénogreffes, les cellules Ts proviennent de préférence du patient et sont stimulées par des CPA ou des tissus provenant du donneur, en présence de cytokines. Les cellules Ts provenant du patient peuvent aussi être
15 stimulées par des CPA autologues en présence de tissus, cellules, fragments cellulaires, protéines purifiées ou peptides provenant du donneur et de cytokines.

Pour traiter les allergies, les cellules Ts proviennent typiquement du patient et sont stimulées par des CPA et des allergènes, en présence de cytokines.

20

Comme indiqué ci-dessus, les cytokines préférentiellement utilisées sont l'IL-2, l'IL-10 et/ou l'IL-15.

Comme indiqué précédemment, les cellules Ts et pTs utilisées pour traiter diverses
25 pathologies telles que le rejet d'un organe transplanté, des maladies auto-immune, les allergies, les pathologies induites par un virus, etc., sont de préférence autologues, i.e., elles proviennent du sujet à traiter. Les cellules syngéniques peuvent également être utilisées. Dans d'autres situations, par exemple dans le cadre du traitement de la GVHD ou d'autres pathologies, les cellules Ts et pTs sont typiquement allogéniques, i.e., elles
30 proviennent d'un être humain différent. Dans ces cas, il est préférable d'utiliser des cellules Ts et pTs provenant d'un sujet donneur (e.g., le sujet donneur des cellules effectrices).

Modification génétique des cellules T et notamment des cellules Ts et pTs

5 Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, les lymphocytes T (population générale des lymphocytes T) présents dans la population de cellules de mammifère ou les lymphocytes T suppresseurs (porteurs du marqueur THY-1) peuvent être modifiés génétiquement de manière à exprimer des produits biologiques d'intérêt.

10 L'expression « génétiquement modifiées » indique que les cellules comprennent une molécule d'acide nucléique qui n'est pas naturellement présente dans les cellules T non modifiées, ou qui est présente dans ces cellules lorsqu'elles ne sont pas dans leur état naturel (e.g., lorsqu'elles sont amplifiées). La molécule d'acide nucléique peut avoir été introduite dans lesdites cellules ou dans une cellule parente ou progénitrice.

15 Un objet particulier de l'invention concerne ainsi une méthode d'obtention ou de production de lymphocytes T suppresseurs (et/ou leurs précurseurs) comprenant :

- (a) l'obtention d'une population de cellules de mammifère comprenant des lymphocytes T,
- (b) la récupération des lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1, et
- 20 (c) la modification génétique desdits lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1 par mise en contact desdits lymphocytes avec une molécule d'acide nucléique recombinant.

25 Un autre objet particulier de l'invention concerne une méthode d'obtention ou de production de lymphocytes T suppresseurs (ou leurs précurseurs) comprenant :

- (a) l'obtention d'une population de cellules de mammifère comprenant des lymphocytes T,
- (b) la modification génétique desdits lymphocytes T par mise en contact de ladite population de cellules avec une molécule d'acide nucléique recombinant, et
- 30 (c) la récupération des lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1.

Plusieurs approches peuvent être utilisées pour modifier sur le plan génétique les cellules T appartenant à la population de cellules de mammifère [assimilable à la population générale des lymphocytes T (cellules T effectrices et cellules Ts)] ou les lymphocytes Ts et pTs, telles que, par exemple, la délivrance de gène par l'intermédiaire d'un virus, l'ADN nu, des traitements physiques, etc. A cette fin, l'acide nucléique est généralement incorporé dans un vecteur, tel qu'un virus recombinant, un plasmide, un phage, un épisode, un chromosome artificiel, etc.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, les cellules T telles que définies au paragraphe précédant, sont modifiées génétiquement à l'aide d'un vecteur viral (ou d'un virus recombinant). L'acide nucléique hétérologue est, par exemple, introduit dans un virus recombinant qui est ensuite utilisé pour infecter des lymphocytes T. Différents types de virus recombinants peuvent être utilisés, en particulier des rétrovirus recombinants ou des AAV. Les lymphocytes T sont de préférence modifiés à l'aide d'un rétrovirus recombinant. L'utilisation de rétrovirus est particulièrement appréciée dans la mesure où l'infection rétrovirale permet une intégration stable de l'acide nucléique dans le génome des cellules. Cette propriété est particulièrement importante, dans la mesure où l'amplification des lymphocytes, qu'elle soit réalisée in vitro ou in vivo après l'injection chez le sujet, requiert que le transgène soit maintenu stable durant la division cellulaire. Des exemples de rétrovirus susceptibles d'être utilisés proviennent de la famille des oncovirus, des lentivirus ou des spumavirus. Des exemples particuliers de la famille des oncovirus sont MoMLV, ALV, BLV ou MMTV mais également RSV, etc. Des exemples de la famille des lentivirus sont HIV, SIV, FIV, EIAV ou CAEV, etc.

Des techniques permettant de construire des rétrovirus recombinants ont été largement décrites dans la littérature (WO 89/07150, WO 90/02806 et WO 94/19478, dont les enseignements sont intégralement incorporés dans la présente demande). Ces techniques comprennent généralement l'introduction d'un vecteur rétroviral comprenant le transgène dans une lignée de cellules d'empaquetage appropriée, suivie de la récupération des virus produits, lesdits virus comprenant le transgène dans leur génome. Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le rétrovirus recombinant comprend l'enveloppe du virus GALV (rétrovirus pseudotypé avec GALV). Il a été

démontré que l'infection des cellules hématopoïétiques par un rétrovirus recombinant est plus efficace lorsque l'enveloppe du rétrovirus provient du rétrovirus GALV (Gibbon Ape Leukemia Virus). En utilisant cette enveloppe rétrovirale, un taux de transduction de plus de 95% des lymphocytes a pu être obtenu avant la sélection des
5 cellules transduites.

Les lymphocytes T peuvent être infectés à l'aide de virus recombinants et au moyen de divers protocoles, tels que l'incubation avec un surnageant de virus, avec des virus purifiés, par coculture de lymphocytes T avec les cellules virales d'empaquetage, par
10 des techniques Transwell, etc. Une méthode particulièrement efficace comprenant une étape de centrifugation a été décrite par Movassagh et al. (Movassagh M, Desmyter C, Baillou C, Chapel-Fernandes S, Guigon M, Klatzmann D, Lemoine FM. Hum Gene Ther. 1998;9:225-234).

15 Les techniques non virales incluent l'utilisation de lipides cationiques, de polymères, de peptides, d'agents synthétiques, etc. Des méthodes alternatives utilisent la technique du « gene gun », les champs électriques, le bombardement, la précipitation, etc. En réalisant la présente invention, il n'est pas nécessaire, que toutes les cellules Ts et pTs soient modifiées génétiquement. Il est ainsi possible d'utiliser une population de
20 lymphocytes T comprenant au moins 50%, de préférence au moins 65%, encore plus préférentiellement au moins 80% de lymphocytes modifiés génétiquement. Des niveaux plus élevés (e.g., jusqu'à 100%) peuvent être obtenus *in vitro* ou *ex vivo* ; par exemple en utilisant l'enveloppe GALV et/ou des conditions d'infection particulières (Movassagh et al.) et/ou en sélectionnant les cellules qui ont effectivement été
25 modifiées génétiquement. Différentes techniques de sélection peuvent être utilisées, incluant l'utilisation d'anticorps reconnaissant des marqueurs spécifiques présents à la surface des cellules modifiées, l'utilisation de gènes de résistance (tel que le gène de résistance à la néomycine et la molécule G418), ou l'utilisation de composés toxiques pour les cellules n'exprimant pas le transgène (i.e., la thymidine kinase). La sélection
30 est de préférence réalisée à l'aide d'un gène marqueur exprimant une protéine membranaire. La présence de cette protéine permet la sélection à l'aide de techniques

conventionnelles de séparation telles que la séparation à l'aide de billes magnétiques, l'utilisation de colonnes ou la cytométrie de flux.

- L'acide nucléique utilisé pour modifier les cellules T sur le plan génétique peut être un transgène thérapeutique et peut coder pour des produits biologiques actifs variés, incluant des polypeptides (e.g., protéines, peptides, etc.), des ARNs, etc. Dans un mode de réalisation préféré, l'acide nucléique code pour un polypeptide présentant une activité immunosuppressive. Dans un autre mode de réalisation, l'acide nucléique code pour un polypeptide toxique ou présentant une toxicité conditionnelle pour les cellules.
- Des exemples préférés incluent la thymidine kinase (qui confère la toxicité en présence d'analogues de nucléoside), telles que HSV-1 TK, une cytosine déaminase, gp_rt, etc. Il peut aussi s'agir d'un polypeptide non toxique mais pouvant permettre l'élimination des cellules injectées en cas de besoin (comme par exemple une molécule exprimée à la membrane cellulaire et un anticorps monoclonal fixant le complément).
- Une autre catégorie préférée d'acides nucléiques sont ceux permettant le ciblage. Il peut s'agir d'acides nucléiques codant pour un récepteur de cellule T ou B ou une sous-unité ou un équivalent fonctionnel de celui-ci. Par exemple, l'expression au sein des cellules Ts d'un TCR recombinant spécifique d'un auto-antigène produit des cellules Ts et pTs qui peuvent agir plus spécifiquement sur des cellules T effectrices qui détruisent un tissu chez un sujet. D'autres types de molécules actives sur le plan biologique incluent des facteurs de croissance, des lymphokines (comprenant diverses cytokines qui activent les cellules Ts), des cytokines immunosuppressives (telles que IL-10 ou TGF- β), des molécules accessoires, des molécules présentatrices d'antigènes, des récepteurs d'antigènes, etc. L'acide nucléique peut coder pour des « T-bodies », i.e., des récepteurs hybrides entre des récepteurs de cellule T et une immunoglobuline. De tels « T-bodies » permettent le ciblage de complexes antigéniques, par exemple.

De manière préférée, les lymphocytes T suppresseurs (ou leurs précurseurs) sont génétiquement modifiés et comprennent un acide nucléique recombinant codant pour un produit présentant une toxicité conditionnelle pour ces cellules, tel que la thymidine kinase. Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, les cellules Ts et pTs génétiquement modifiées comprennent une molécule d'acide nucléique recombinant

codant pour un récepteur de cellule T ou pour une sous-unité ou pour un équivalent fonctionnel de celui-ci.

Dans certaines indications, comme notamment la greffe de moelle osseuse allogénique, on peut être amené à réaliser des préparations séparées de lymphocytes Ts (et pTs) et T effecteurs, chacun exprimant un gène différent codant un produit présentant une toxicité conditionnelle, et permettant ainsi d'éliminer si nécessaire l'une ou l'autre des populations cellulaires.

L'acide nucléique qui est introduit dans les cellules T selon l'invention comprend typiquement, en plus de la région codante, des séquences de régulation, telle qu'un promoteur et une séquence de polyadénylation.

Compositions

Un objet particulier de cette invention est une composition comprenant au moins un lymphocyte T suppresseur selon l'invention, e.g. isolé, génétiquement modifié et/ou amplifié ex vivo, ou une population enrichie en cellules T suppresseurs telle que définie précédemment ou au contraire une population déplétée en cellules T suppresseurs, ainsi qu'un adjuvant ou un milieu acceptable sur le plan pharmaceutique.

Un autre objet particulier de l'invention est une composition comprenant des lymphocytes T suppresseurs (y compris leurs précurseurs) transduits à l'aide d'un premier gène suicide et des cellules T effectrices transduites à l'aide d'un second gène suicide, différent du premier.

Les compositions peuvent comprendre d'autres types cellulaires, sans affecter de façon significative le bénéfice thérapeutique desdites compositions.

Selon un mode de réalisation préféré, les cellules sont conditionnées dans une composition comprenant entre environ 10^5 et 10^{10} cellules T suppresseurs selon la pathologie à traiter, plus généralement entre 10^5 et environ 10^9 cellules T suppresseurs.

Une composition particulière au sens de l'invention comprend une population de lymphocytes humains THY-1 positifs, doués de propriétés suppressives vis-à-vis de cellules T effectrices.

- 5 Le milieu ou adjuvant peut être tout milieu de culture, milieu défini, soluté ou suspension aqueuse, tamponnée, éventuellement supplémentée par des agents conservateurs. Les compositions selon l'invention peuvent être administrées par toute voie appropriée, telle que intraveineuse, intraartérielle, sous-cutanée, transdermique, etc. Des administrations répétées de telles compositions peuvent être mises en œuvre.

10

- D'autres compositions particulières selon l'invention comprennent un ligand spécifique de Thy-1 couplé ou conjugué à une molécule effectrice, par exemple une molécule présentant une toxicité (conditionnelle ou non, par exemple une TK, toxine de ricin, etc.) ou une activité stimulante pour les lymphocytes T (par exemple une cytokine, 15 notamment IL-2, IL-7, IL-15, etc.). De telles compositions peuvent être utilisées in vivo (ou ex vivo) pour moduler le répertoire ou l'activité des cellules T suppresses chez un sujet. Ainsi, l'administration d'un conjugué comprenant une molécule toxique peut permettre d'inactiver ou de réduire l'activité de cellules T suppresses chez un sujet, et donc d'augmenter l'activité de cellules effectrices. Inversement, l'administration d'un 20 conjugué comprenant une molécule activatrice peut permettre de stimuler l'activité de cellules T suppresses chez un sujet, et donc de réduire l'activité de cellules effectrices. Le couplage peut être covalent ou non.

- D'autres compositions particulières de l'invention comprennent un agent de transfection 25 couplé à un ligand spécifique de Thy-1. Un tel couplage permet de cibler ou de favoriser l'interaction entre l'agent de transfection et les cellules Ts. L'agent de transfection peut être une particule virale (par exemple recombinante, déficiente, atténuée, synthétique, etc.) ou un agent de transfection non-viral, tel qu'un liposome, un lipide cationique, un polymère, etc. Le couplage peut être covalent ou non. De telles 30 compositions permettent de modifier de manière cibler les cellules T suppresses d'un sujet, par exemple pour leur conférer de nouvelles propriétés.

Utilisations

La présente invention permet d'obtenir des populations cellulaires utilisables pour le traitement de pathologies variées, associées à l'activité des cellules T, comme indiqué
5 ci-dessus. Le traitement peut être préventif ou curatif. De plus, les cellules T suppresseurs (y compris les cellules pTs), les populations cellulaires enrichies en cellules T suppresseurs (y compris les cellules pTs) et les compositions selon l'invention peuvent être utilisées en combinaison avec d'autres agents ou principes actifs, tels que d'autres populations cellulaires, des molécules ou des conditions
10 immunosuppressives, des irradiations, des produits de thérapie génique, etc.

Le terme traitement signifie la diminution des symptômes ou des causes d'une maladie, la régression d'une maladie, le retardement d'une maladie, l'amélioration de l'état de patients, la réduction de leur souffrance, l'augmentation de leur durée de vie, etc.

15 Les cellules T suppresseurs (y compris les cellules pTs), les populations cellulaires enrichies en cellules T suppresseurs (y compris les cellules pTs) et les compositions selon l'invention sont particulièrement adaptées pour retarder ou prévenir la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) chez les sujets ayant subi une transplantation d'organe allogénique, en particulier de moelle osseuse (ou de cellules souches hématopoïétiques
20 ou de cellules souches non hématopoïétiques). La GVHD et les fréquentes complications provoquées par la transplantation de cellules souches hématopoïétiques sont dues à la présence de cellules T donneuses matures dans le transplant. Cependant, l'élimination de ces cellules avant la greffe conduit à un échec de cette dernière, prolonge l'immunosuppression et la réapparition d'une leucémie. L'administration de
25 cellules Ts selon l'invention au moment de la greffe retarde ou même prévient la GVHD. A l'inverse, il peut être avantageux de dépleter les cellules T suppresseurs (y compris les cellules pTs) d'un greffon pour augmenter la réactivité des cellules injectées contre les cellules leucémiques résiduelles. Cette déplétion des cellules THY-1 peut être
30 ou non associée à une déplétion à l'aide d'autres anticorps comme par exemple ceux spécifiques de CD25.

Les cellules T suppresseurs (y compris les cellules pTs), les populations cellulaires enrichies en cellules T suppresseurs (y compris les cellules pTs) et les compositions selon l'invention sont également adaptées au traitement des maladies auto-immunes (incluant les maladies inflammatoires chroniques), telles que le lupus systémique érythémateux, l'arthrite rhumatoïde, la polymyosite, la sclérose multiple, le diabète, l'athérosclérose etc. Les maladies auto-immunes ont une composante immunologique comme de nombreuses investigations biologiques et histologiques ont pu le démontrer. Pour ces maladies, l'élément central, est une réponse immunitaire inadaptée. De plus, il est souvent possible d'identifier l'auto-antigène dans le cadre de ces maladies et de définir la période durant laquelle les cellules T délétères sont activées. La présente invention peut être utilisée pour prévenir, traiter, réduire ou atténuer de telles pathologies en administrant au sujet une quantité efficace de cellules T suppresseurs (y compris les cellules pTs) pour supprimer ou réduire l'activité de ces cellules T délétères. Des administrations répétées peuvent être réalisées si besoin.

Les cellules T suppresseurs (y compris les cellules pTs), les populations cellulaires enrichies en cellules T suppresseurs (y compris les cellules pTs) et les compositions selon l'invention peuvent également être utilisées dans le cadre du traitement des maladies infectieuses et notamment des pathologies immunitaires induites par des virus. La réponse immune dirigée contre les agents infectieux peut avoir des conséquences immunopathologiques qui peuvent conduire à la mort. Un exemple est la réponse à certains virus responsables de l'hépatite. Ces virus se répliquent dans les hépatocytes et la destruction de ces hépatocytes infectés par le système immunitaire provoque une hépatite, qui est parfois mortelle. L'évolution de cette hépatite chronique est accompagnée de signes biologiques et d'une réponse immunitaire anormale (par exemple, la présence d'anticorps anti-ADN ou d'une cryoglobulinémie). Les cellules T suppresseurs (y compris les cellules pTs), les populations cellulaires enrichies en cellules T suppresseurs (y compris les cellules pTs) et les compositions selon l'invention permettent d'éliminer, supprimer ou réduire les lymphocytes T actifs responsables de la pathologie et ainsi de réduire les conséquences des pathologies immunitaires induites par des virus.

Les cellules T suppressseurs (y compris les cellules pTs), les populations cellulaires enrichies en cellules T suppressseurs (y compris les cellules pTs) et les compositions selon l'invention peuvent également être utilisées pour le traitement ou la prévention du rejet d'organes transplantés tels que le cœur, le foie, les reins, les poumons, le pancréas, etc. Le traitement habituel d'un certain nombre de désordres affectant les organes consiste, lorsque cela devient nécessaire, en un remplacement de l'organe par un organe sain provenant d'un donneur décédé (ou d'un donneur vivant dans certains cas, ou même d'un donneur d'une autre espèce). C'est également le cas pour le traitement des diabètes insulino-dépendants, à travers la greffe de cellules ou d'un organe producteur d'insuline, tels que le pancréas ou les îlots pancréatiques. Même si un grand soin est pris dans la sélection de donneurs d'organes présentant un maximum de compatibilité vis-à-vis des antigènes d'histocompatibilité, l'organe transplanté conduit toujours, à l'exception des transplants réalisés entre jumeaux homozygotes, au développement d'une réponse immune dirigée contre les antigènes spécifiquement exprimés par cet organe. En dépit des traitements immunosuppresseurs menés, cette réaction aboutit souvent au rejet de l'organe transplanté (il s'agit de la principale cause d'échec des transplants allogéniques). A l'exception de certains rejet super-aigus ou aigus qui impliquent essentiellement des réponses humorales le rejet de l'organe transplanté est, dans la majorité des cas, essentiellement médié par les lymphocytes T effecteurs.

La présente invention permet désormais d'envisager un traitement (e.g. la diminution ou le retardement) du rejet d'organe à l'aide de cellules T suppressseurs (y compris les cellules pTs). De telles cellules peuvent être préparées à partir de cellules du patient, stimulées avec les antigènes du donneur et ré-administrées au patient, avant ou pendant la transplantation d'organe. Des administrations répétées peuvent être réalisées si besoin. Cette approche est particulièrement adaptée au traitement des diabètes, i.e., pour réduire, retarder ou prévenir le rejet de cellules productrices d'insuline, de tissus ou d'organes (en particulier les îlots pancréatiques) transplantés. Typiquement, les cellules Ts sont amplifiées et activées par culture en présence d'auto-antigènes provenant du tissu donneur. Ces cellules peuvent être produites par exemple par culture en présence de cellules dendritiques autologues par rapport à la greffe. Ces cellules T suppressseurs (y compris les cellules pTs) amplifiées et activées peuvent être injectées au patient avant,

pendant et/ou après la transplantation d'organe, réduisant ainsi l'activité destructrice des cellules T effectrices.

Les cellules T suppresseurs (y compris les cellules pTs), les populations cellulaires enrichies en cellules T suppresseurs (y compris les cellules pTs) et les compositions selon l'invention sont également adaptées au traitement des allergies, qui sont médiées par des réponses immunes dirigées contre des antigènes particuliers appelés allergènes. En administrant aux patients les cellules T suppresseurs (y compris les cellules pTs), éventuellement activées ex vivo avec de tels allergènes, il est possible de réduire ces réponses immunitaires délétères.

Un autre objet de l'invention concerne une méthode de diminuer l'activité (et ou la quantité de lymphocytes T effecteurs) chez un mammifère hôte, ladite méthode comprenant l'administration au mammifère de lymphocytes T suppresseurs (ou leurs précurseurs) selon l'invention compatibles avec ledit mammifère hôte, de préférence autologues.

La diminution des lymphocytes T suppresseurs (ou leurs précurseurs) peut également être recherchée (par exemple dans le cadre du traitement d'un cancer). Plusieurs modalités de traitement peuvent être utilisées.

Une première approche consiste à préparer ex vivo des cellules ayant une activité (par exemple anti-cancéreuse), déplétées en cellules T suppresseurs (y compris les cellules pTs). Une telle déplétion peut être réalisée ex vivo conformément à une méthode selon l'invention telle que décrite précédemment. La déplétion peut être réalisée ex vivo sans phase préalable de culture et/ou après une phase de culture dans un milieu contenant de la N-acetyl cystéine qui diminue la prolifération des lymphocytes Ts (y compris les cellules pTs) (voir figure 1). Le traitement consiste alors en la ré-administration au patient d'une population de lymphocytes T ou d'une composition comprenant une telle population dépourvue de cellules T suppresseurs (y compris les cellules pTs), et ayant ou non été activé ex vivo. Ce traitement peut être accompagné d'une ou plusieurs vaccinations (par exemple anti-tumorales), combinées ou non à de la chimiothérapie et/ou radiothérapie, chez un patient ayant éventuellement reçu un conditionnement. Ce

conditionnement peut notamment comprendre des traitements lympho-ablatifs, myeloablatifs ou non, destinés à éliminer les lymphocytes T, notamment les lymphocytes T en division, et qui comprennent les T suppresseurs (y compris les cellules pTs) responsables de l'absence de réponse immunitaire efficace (comme par exemple les Ts qui empêchent le développement d'une réponse anti-tumorale efficace). Une autre modalité consiste à dépléter les T suppresseurs in vivo par l'utilisation de ligand et de tout activité ou molécule toxique adéquate (comme par exemple radioactivité ou toxine).

- 10 Le traitement de toutes ces pathologies peut également être réalisé par une modulation (suppression ou activation) in vivo des T suppresseurs (y compris les cellules pTs) à l'aide de toutes molécules ayant ces activités, et notamment des anticorps anti-THY1, ou toutes molécules modulant l'activité des T suppresseurs (y compris les cellules pTs) dont la découverte résulte de la connaissance du transcriptome et protéome des T
- 15 suppresseurs (y compris les cellules pTs).

Les lymphocytes T suppresseurs (y compris les cellules pTs) peuvent aussi être activés in vivo, par exemple par des ligands de thy-1 couplés à des molécules d'activation des lymphocytes (IL2, IL10 par exemple). Le traitement peut alors être administré par voie

20 générale (intra-veineuse par exemple) ou sur le site où l'action est recherchée (dans le liquide synovial lors du traitement de la Polyarthrite rhumatoïde par exemple).

Un objet particulier de la présente demande correspond à l'utilisation, dans le cadre de la vaccination, d'une cellule T suppresseur (y compris les cellules pTs), d'une

25 population cellulaire enrichie en cellules T suppresseurs (y compris les cellules pTs) ou d'une composition selon l'invention.

Des voies d'administrations et des protocoles variés peuvent être mis en œuvre dans le cadre de la présente invention. Ils peuvent être adaptés par l'homme du métier en

30 fonction de la pathologie à traiter. Généralement, des administrations systémiques ou locales peuvent être envisagées et empruntent la voie intraveineuse, intra-artérielle, intra-péritonéal, intra-musculaire ou sous-cutanée, etc. Les cellules peuvent être

injectées durant l'opération chirurgicale ou par tout moyen approprié, à l'aide par exemple, d'une seringue. Pour contrôler des maladies telles que la GVHD, les effets greffe contre infection (GVI) ou greffe contre leucémie (GVL) ou encore le rejet d'un organe transplanté, la composition cellulaire peut être administrée avant, pendant ou
5 après la transplantation de la moelle osseuse (ou de l'organe). De plus, des administrations additionnelles peuvent être réalisées après la transplantation, de façon à prévenir ou retarder la pathologie.

Il est entendu que la présente invention n'est pas limitée aux modes spécifiques de
10 réalisation décrits ci-après, mais s'étend également aux variantes d'exécution entrant dans les connaissances normales de l'homme du métier.

LEGENDES DES FIGURES

15 Figure 1 : Effet de la N-acetyl Cysteine sur l'expansion préférentielle ou non des lymphocytes T humains CD90+

Des lymphocytes T purifiés CD3+ ont été mis en culture en milieu RPMI contenant 10% de sérum humain, de l'interleukine 2, des anticorps anti-CD3 et présence ou non de N-acetyl Cysteine (NAC). Le pourcentage de cellules T CD3+ exprimant le
20 marqueur CD90 a été étudié au cours du temps par cytométrie en flux.

Figure 2 : Effet des cellules dendritiques sur l'expansion préférentielle ou non des lymphocytes T humains CD4+ CD90+.

Des cellules dendritiques (DC) dérivées de cellules CD34+ et enrichies sur le marqueur
25 CD1a (DC langerhansiennes) ou sur le marqueur CD14 (DC intersticielles) ont été cultivées avec des lymphocytes T allogéniques dans un rapport 1/5 pendant 5 jours. Le pourcentage de cellules T CD3+ exprimant le marqueur CD90 a été étudié au cours du temps par cytométrie en flux.

30 Figure 3 : Expression des antigènes CD25 et CD90 par les lymphocytes T humains CD4+ (A) et CD8+ (B).

Des cellules T ont été marquées avec des anticorps reconnaissant les antigènes CD4, CD8, CD25 et CD90. L'expression de ces différents marqueurs a été réalisée par cytométrie en flux.

- 5 Figure 4 : Les lymphocytes T CD4+/CD90+ et CD8+/CD90+ ont une fonction suppressive

Les populations purifiées CD4CD90+, CD4CD25++ et CD8CD90+ ont été irradiées à 15 grays, mis en culture à rapport égal pendant 4 jours avec des lymphocytes T autologues déplétés en cellules CD25 (CD25-) stimulés (A) par un mélange d'anticorps
10 OKT3/CD28, (B) par des lymphocytes B allogéniques transformés par EBV, (C) par des cellules dendritiques (DC) allogéniques. Les cellules CD25- stimulées seules dans les mêmes conditions représentent le contrôle positif. La prolifération est évaluée après 4 jours par incorporation de thymidine tritiée.

- 15 Figure 5 : expression du gène FoxP3 par les lymphocytes T CD4+/CD90+ et CD8+/CD90+

L'expression des gènes CD4, IL-10, CTLA-4 et FoxP3 a été réalisée par RT-PCR sur les différentes populations cellulaires CD4+CD25-, CD4+CD25++, CD4+CD90+, CD8+CD90+ purifiées.

20

Figure 6 : CD90 identifie les précurseurs des lymphocytes suppresseurs CD4CD25++

Les populations cellulaires CD4CD90+, CD4CD25+, CD4CD25++ ont été hautement purifiées par tri cellulaire, cultivées en milieu RPMI contenant du sérum humain AB, de l'IL-2 et un mélange d'anticorps OKT3/CD28 pendant 7 jours. L'analyse des
25 marqueurs CD90 et CD25 a été réalisée à différents temps de culture. Au jour 7, les populations ont été enrichies par tri cellulaire, irradiées à 15 grays et testées pour leur capacité suppressive en les co-cultivant à rapport égale avec des lymphocytes T allogéniques doublement déplétés en cellules CD25 et CD90 (CD25-CD90-) stimulés par mélange d'anticorps OKT3/CD28. Les chiffres indiquent le pourcentage
30 d'inhibition de la prolifération comparativement au témoin (cellules CD25-CD90- cultivées et stimulées seules).

Figure 7 : CD90 identifie les lymphocytes CD4+/CD90+ et CD8+/CD90+ suppresseurs après 6 jours de culture

Des lymphocytes T CD3 ont été cultivés en présence d'IL-2 et d'un mélange d'anticorps OKT3/CD28 pendant 6 jours. L'analyse des marqueurs CD25 et CD90 sur
5 les populations CD4 et CD8 permet de déterminer les pourcentages CD25+ et CD90+
(A). Les cellules CD4CD25++, CD4CD90+ et CD8CD90+ ont ensuite été triées, irradiées et testées pour leur capacité suppressive en les co-cultivant à rapport égale avec des lymphocytes T allogéniques déplétés en cellules CD25 (CD25-) stimulés par
10 mélange d'anticorps OKT3/CD28 (B). La prolifération est évaluée après 4 jours par incorporation de thymidine tritiée.

Figure 8 : CD90 permet d'identifier à partir de culture de lymphocytes T CD25-CD90- l'apparition de cellules précurseurs et de lymphocytes suppresseurs

Des lymphocytes T doublement déplétés en cellules CD25 et CD90 (CD25-CD90-) ont
15 été cultivés en présence d'IL-2 et d'un mélange d'anticorps OKT3/CD28 pendant 7 jours. L'analyse des marqueurs CD90 et CD25 a été réalisée à différents temps de culture. Au jour 7, la population CD25+CD90+ a été enrichie par tri cellulaire, irradiée à 15 grays et testée pour sa capacité suppressive en la co-cultivant à rapport égale avec des lymphocytes T allogéniques doublement déplétés en cellules CD25 et CD90 (CD25-
20 CD90-) stimulés par mélange d'anticorps OKT3/CD28. Les chiffres indiquent le pourcentage d'inhibition de la prolifération comparativement au témoin (cellules CD25-CD90- cultivées et stimulées seules).

Figure 9 : Utilisation du marqueur CD90 en pathologie humaine : exemple de la
25 sclérose en plaques.

Des cellules mononucléées obtenues après Ficoll à partir de prélèvements de donneurs sains (n=6), de patients atteints de sclérose en plaques en phase chronique (multiple sclerosis MS n=5), de patients atteints de sclérose en plaques en poussées évolutives (activ MS n= 3) ont été marquées par anticorps monoclonaux CD4, CD25, CD90. Le
30 pourcentage de cellules T CD4+ exprimant le marqueur CD25 et CD90 a été étudié par cytométrie en flux.

Figure 10 : Utilisation du marqueur CD90 en pathologie humaine : exemple d'un patient atteint du syndrome IPEX.

Des cellules mononucléées obtenues après Ficoll à partir de prélèvement de donneurs sains, de patients atteints du syndrome IPEX confirmé par séquençage du gène FoXP3
5 ont été marquées par anticorps monoclonaux CD4, CD25, CD90. Le pourcentage de cellules T CD4+ exprimant le marqueur CD25 et CD90 a été étudié par cytométrie en flux. Les résultats d'un patient IPEX sont montrés.

EXEMPLES

10

1. Le marqueur CD90 est exprimé par les lymphocytes T CD4+/CD25+ humains et par les lymphocytes CD8+/CD25+ humains

Afin d'étudier l'expression du marqueur CD90 comparativement à CD25 sur les
15 populations lymphocytaires T CD4+ et CD8+, des cellules mononucléées du sang périphérique adulte ont été obtenues par gradient de Ficoll puis marquées avec les anticorps suivants directement à des fluorochromes : anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25 et anti-CD90. Pour l'analyse immunophénotypique, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux (FACScalibur), les événements étant ré-analysés sur les logiciels
20 Cellquest et FlowJo.

La figure 3 A montre l'expression des marqueurs CD25 et CD90 sur les lymphocytes T CD4+ ainsi que la co-expression de CD25 et CD90 au sein des cellules CD4+. Comme on peut le voir, 6 % et 1.2 % des lymphocytes T CD4+ expriment, respectivement, les
25 marqueurs CD25 et CD90. La majorité (>80%) des cellules CD4+/CD90+ expriment CD25+ à un niveau intermédiaire tandis qu'environ 5% et 15% des cellules CD4+/CD90+ sont respectivement CD25++ et CD25-.

La figure 3 B montre l'expression des marqueurs CD25 et CD90 sur les lymphocytes T
30 CD8+ ainsi que la co-expression de CD25 et CD90 au sein des CD8+. Comme on peut le voir, 7% et 0,2 % des lymphocytes T CD8+ expriment, respectivement, les marqueurs CD25 et CD90. Il faut noter qu'aucune cellule CD8+ n'exprime fortement CD25

contrairement aux cellules CD4+. La majorité des cellules CD8+/CD90+ (75%) sont CD25- tandis qu'environ 25% des cellules CD8+/CD90- sont CD25+.

2. Le marqueur CD90 identifie des lymphocytes T suppresseurs humains au sein des populations CD4+ et CD8+.

Afin de montrer que les cellules CD4+/CD90+ ont une fonction suppressive, des lymphocytes T autologues CD4+ déplétés en cellules CD4+/CD25+ (CD25-) ont été stimulés par un mélange d'anticorps OKT3/CD28 préalablement immobilisé sur le fond des puits de culture. Les cellules CD25- ont été cultivées seules ou en présence d'un nombre égal de cellules CD4+/CD90+ ou CD4+/CD25+ (contrôle positif) pendant 4 jours puis la prolifération a été mesurée par test d'incorporation de thymidine tritiée, la lecture étant faite sur compteur β . Dans ces expériences les cellules CD4+/CD90+ ou CD4+/CD25+ ont été préalablement irradiées à 15 grays. Les résultats sont exprimés en cpm. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante : %inhibition = $\frac{\text{Nb cpm (CD25- + Ts)} - \text{Nb cpm (CD25-)}}{\text{Nb cpm (CD25-)}} \times 100$.

La figure 4A montre l'inhibition qu'exercent les populations CD4+/CD90+ et CD4+/CD25++ sur la prolifération de lymphocytes T autologues CD25-. Les résultats obtenus montrent que les cellules CD4+/CD90+ inhibent de plus de 75% la prolifération des cellules CD25-, révélant ainsi leur fonction suppressive.

Des expériences utilisant des cellules EBV allogéniques ou des cellules dendritiques (DC) allogéniques comme stimuli de prolifération des cellules CD25- ont également été effectuées. En ajoutant des cellules CD4+/CD90+ ou CD4+/CD25+, il a été montré que ces dernières exerçaient une action suppressive sur la prolifération cellulaire des cellules CD25-. Les figures 4B et 4C montrent ces résultats.

Afin de montrer que les cellules CD8+/CD90+ ont une fonction suppressive, celles-ci ont été mises en présence à nombre égal de cellules CD25- stimulées par mélange par un mélange d'anticorps OKT3/CD28, la prolifération cellulaire étant évaluée quatre jours plus tard par test d'incorporation de thymidine tritiée. Les résultats présentés

figure 4A montrent que la population CD8+/CD90+ exerce une fonction suppressive sur la prolifération des cellules CD25-.

3. Les lymphocytes CD4+/90+ et CD8+CD90+expriment Foxp3, CTLA4 et TGFβ

5

L'analyse de l'expression des gènes Foxp3, CTLA4, CD4, CD25, TGFβ a été réalisée par PCR nestée après transcription inverse de l'ARN extrait de 1000 ou 5000 cellules issues des différentes populations lymphocytaires étudiées. Les résultats obtenus (Figure 5) montrent que les lymphocytes CD4+/90+ et CD8+CD90+expriment Foxp3, CTLA4 et TGFβ comme les cellules CD4+CD25++.

10

4. CD90 permet d'identifier une population de lymphocytes précurseurs des lymphocytes CD4+/CD25+.

15

Afin d'étudier si la population CD4+/CD90+ a un lien avec les cellules CD4+/CD25++, les cellules CD4+/CD90+ ont été hautement purifiées par cytométrie en flux (pureté supérieure à 98 %) puis mises en culture en milieu liquide en présence d'un mélange d'anticorps OKT3/CD28 et d'Interleukine 2. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux de façon séquentielle entre le 1^{er} jour de culture et le 7^{ème} jour de culture au niveau des marqueurs CD4/CD90 et CD4/CD25. Les populations triées CD4+/CD25++ et CD4+/CD25+/CD90- qui représentent respectivement les lymphocytes T supresseurs conventionnels et les lymphocytes T activés ont été cultivées en parallèle dans les mêmes conditions. Les résultats présentés figure 6 indiquent que les cellules CD4+/CD90+ perdent progressivement le marqueur CD90 et deviennent fortement positives pour le marqueur CD25. L'évolution immunophénotypique des cellules CD4+/CD25++, qui étaient initialement CD90-, indique que cette population surexprime encore plus fortement après quelques jours de culture le marqueur CD25 sans acquisition du marqueur CD90. La population CD4+/CD25+/CD90- acquiert fortement le marqueur CD25 sans acquisition du marqueur CD90. Afin d'étudier la fonction suppressive de ces différentes populations après culture, les cellules ont été triées, irradiées à 15 grays et mises en présence de cellules CD25- allogéniques.

20

25

30

Les résultats indiquent que 1) les cellules CD4+/CD90+ sont capables de donner naissance à des cellules CD4+/CD25++ à activité suppressive; 2) les cellules CD4+/CD25++ conservent leur activité suppressive; 3) les CD4+/CD25+/CD90- donnent naissance à des cellules CD25++ sans activité suppressive. Ces résultats montrent que les cellules CD4+/CD90+ sont capables de donner naissance à des cellules CD4+CD25++ suppressives et peuvent être considérées comme des cellules précurseurs (pTs) de lymphocytes supresseurs (Ts).

5. CD90 permet d'identifier les lymphocytes CD4+/CD90+ et CD8+/CD90+ supresseurs après culture.

Afin d'étudier si le marqueur CD90 permet, après activation et culture de lymphocytes T, d'identifier les lymphocytes T supresseurs contrairement au marqueur CD25 également exprimé par les lymphocytes T activés, nous avons cultivé, en milieu liquide RPMI 1640 en présence 10% de sérum humain AB et 5 μ d'anticorps OKT3, des lymphocytes T totaux dont les populations CD4+/CD90+, CD8+/CD90+ et CD4+/CD25+ ont été purifiées par cytométrie en flux après 6 jours de culture. Après culture, les différents types de cellules ont été analysés par cytométrie et testés pour leurs fonctions suppressives.

La figure 7A montre l'expression des marqueurs CD25 et CD90 sur les lymphocytes T CD4+ et CD8+ après 6 jours de culture. Comme on peut le voir, 6,9 % et 10 % des lymphocytes T CD4+ et CD8+ expriment respectivement le marqueur CD90, tandis que 84 % et 94,3 % des lymphocytes T CD4+ et CD8+ expriment le marqueur CD25.

La figure 7B montre l'inhibition qu'exercent les populations CD4+/CD90+ et CD8+/CD90+ sur la prolifération de lymphocytes T autologues CD25- tandis que les lymphocytes CD4+/CD25+ n'ont plus aucun effet supresseur sur les cellules CD25- après culture. Ces résultats montrent que le marqueur CD90 reste un marqueur spécifique, contrairement au marqueur CD25, de populations suppressives au sein des lymphocytes T CD4+ et CD8+ cultivés.

6. CD90 permet d'identifier à partir de culture de lymphocytes T CD25-CD90- l'apparition de cellules précurseurs et de lymphocytes suppresseurs.

Afin d'étudier si le marqueur CD90 permet, après activation et culture de lymphocytes T doublement déplétés en cellules CD25 et CD90 (cellules CD25-CD90-), d'identifier encore des lymphocytes T suppresseurs, nous avons cultivé, en milieu liquide RPMI 1640 en présence 10% de sérum humain AB et 5microgr d'anticorps OKT3 des lymphocytes T CD25-CD90-. L'analyse des marqueurs CD25 et CD90 a été réalisée à différents temps de culture par cytométrie en flux. Les résultats (Figure 8) montrent l'apparition de deux voies de différenciation dès 24 heures de culture. Ainsi, il est possible de détecter des cellules CD90+CD25- concomitamment avec l'apparition de cellules CD25+CD90-. A partir de 2-3 jours, les cellules CD90+ deviennent CD90+CD25++ tandis que les cellules CD25+CD90- deviennent CD25++CD90-. Le tri et l'étude fonctionnelle des cellules CD90+CD25++ montrent que ces cellules inhibent la prolifération de lymphocytes T autologues CD25-CD90- stimulées par des anticorps OKT3/CD28. Ces résultats montrent qu'il est possible de générer des lymphocytes T suppresseurs identifiables grâce au marqueur CD90 à partir de lymphocytes T CD25-CD90-.

7. Identification et suivi diagnostique

Nous avons montré que les patients présentant des complications auto-immunes d'une hépatite C présentent un déficit en lymphocytes CD4+CD25+ (Boyer et al. Blood, in press). D'autres auteurs ont montré un tel déficit pour le diabète de type I. Le diagnostic de ces pathologies et le suivi biologique et clinique sera plus spécifique en suivant les Ts par un marquage CD90 qui identifie notamment une population précurseurs des Ts. Ce suivi sera d'autant plus important pour les maladies évoluant par poussées, comme la polyarthrite rhumatoïde ou la SEP par exemple. Le choix et la date de l'intervention thérapeutique, qui pourra notamment être une injection de Ts, sera défini grâce au suivi des Ts par le marqueur CD90. L'identification des Ts est réalisée dans tout liquide biologique d'intérêt (sang, LCR, liquide synovial par exemple) ou dans tout tissu ou organe d'intérêt (tumeur, organe transplanté, etc.).

A titre d'exemple nous avons étudié des patients atteints de SEP en phase chronique (MS) et en poussées évolutives (activ MS). La figure 9 montre une augmentation des lymphocytes T CD4+CD25+ (lymphocytes T activées) et au contraire une diminution des cellules CD4+CD90+ au cours des SEP en poussées comparativement aux SEP en phase chronique ou au groupe contrôle. Ces résultats montrent l'intérêt du marqueur CD90 pour évaluer la diminution de lymphocytes T supresseurs au cours d'une poussée de maladie auto-immune en les distinguant notamment de lymphocytes T activés.

A titre d'exemple nous avons étudié des patients atteints du syndrome IPEX. La figure 10 montre la quasi-absence dans le sang de cellules CD4+/CD90+ chez un patient IPEX comparativement à un donneur sain tandis que l'utilisation du marqueur CD25 qui reconnaît également des lymphocytes T activés ne permet pas de faire une telle différence.

8. Injection Thérapeutique de Ts pour le contrôle de la GVH.

Nous avons montré que les Ts jouent un rôle important dans le contrôle de la GVH et qu'il est possible de préparer des Ts spécifiques par allo-activation (Cohen et al. JEM 2003, Trénado et al., JCI 2003). Pour ces applications les Ts peuvent être obtenues à partir du sang, du sang de cordon, de la moelle osseuse de tous tissus contenant des lymphocytes T. Dans ces applications, elles peuvent être ou non modifiées génétiquement.

9. Injection Thérapeutique de Ts pour le contrôle de la SEP.

Les Ts sont obtenues du patient ou d'un donneur compatible, de préférence géno-identique. Elles sont purifiées par billes immunomagnétiques, cytométrie en flux, par adhérence sur support solide recouvert d'anticorps spécifiques (panning) et éventuellement congelées. Le patient est l'objet d'un suivi biologique pour évaluer son nombre de cellules Ts. L'apparition de signes cliniques indiquant le début d'une

poussée ou d'une chute du nombre de Ts conduit à l'injection des Ts qui sont soit préparées à cette occasion, soit celles préparées précédemment.

10. Ablation des Ts pour le traitement de tumeurs

5

Nous avons montré que les Ts empêchent le développement de réactions immunitaires anti-tumorales efficaces. La déplétion de ces cellules permet à ces réponses de se développer. De plus, la préparation de lymphocytes T anti-tumoraux ex vivo se heurte au problème de leur contamination par les Ts.

- 10 Le principe du traitement est donc d'éliminer les Ts in vivo, notamment à l'aide d'un ligand de CD90 couplé à un toxique. Il peut également s'agir de dépléter l'ensemble des lymphocytes T par des traitements classiques (sérum anti-lymphocytaires, anti-CD3, anticorps Campath, irradiation, etc., par exemple). Ce traitement peut être complété par
- 15 avoir été déplétés en Ts.

REVENDICATIONS

1. Méthode d'obtention, de préparation ou de production de lymphocytes T
suppresseurs humains (et/ou leurs précurseurs), comprenant une étape de
5 sélection, de séparation ou d'isolement in vitro ou ex vivo des lymphocytes T
humains exprimant la molécule THY-1.
2. Méthode selon la revendication 1, comprenant :
(a) l'obtention d'une population de cellules d'origine humaine comprenant des
10 lymphocytes T, et
(b) la récupération des lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1.
3. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'étape (b) est précédée
ou suivie d'une étape d'amplification des lymphocytes T.
15
4. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en
ce que les lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1 sont sélectionnés,
séparés, isolés ou récupérés au moyen d'un ligand spécifique de THY-1.
- 20 5. Méthode selon la revendication 4, caractérisée en ce que le ligand spécifique est
un anticorps spécifique de THY-1 ou un fragment ou dérivé d'un tel anticorps
ayant substantiellement la même spécificité antigénique.
6. Méthode selon la revendication 5, caractérisée en ce que le ligand spécifique est
25 un anticorps monoclonal ou polyclonal spécifique de THY-1.
7. Méthode selon la revendication 5, caractérisée en ce que le ligand spécifique est
un anticorps polyfonctionnel, monocaténaire ou multimérique, spécifique de
THY-1.
30
8. Méthode selon la revendication 4, caractérisée en ce que le ligand spécifique est
un aptamère.

9. Méthode selon l'une des revendications 4 à 8, caractérisée en ce que le ligand est immobilisé sur un support ou placé en solution.
- 5 10. Méthode selon la revendication 9, caractérisée en ce que le support est une colonne ou une bille, de préférence une bille magnétique.
11. Méthode selon l'une des revendications 4 à 10, caractérisée en ce que le ligand est marqué.
- 10 12. Méthode selon la revendication 11, caractérisée en ce que le marquage est réalisé à l'aide d'un marqueur de détection fluorescent, radioactif, luminescent, phosphorescent, chimique ou enzymatique.
- 15 13. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'étape de récupération, sélection ou d'isolement est réalisée par cytométrie de flux, chromatographie d'affinité, FACS, MACS ou D/MACS.
- 20 14. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la population cellulaire provient d'un tissu choisi parmi la moelle osseuse, la rate, le foie, le thymus, du sang ayant ou non été préalablement enrichi en lymphocytes T, du sang de cordon ombilical, du sang périphérique foetal, de nouveaux-nés ou d'adulte, d'une tumeur, d'un site inflammatoire, d'un organe transplanté ou d'une culture de cellules établie avec l'un ou l'autre desdits tissus.
- 25 15. Méthode d'identification et/ou de quantification de lymphocytes T suppresseurs humains dans une population cellulaire, comprenant l'exposition de ladite population cellulaire à un ligand spécifique de THY-1 et la détermination et/ou la quantification de la formation d'un complexe entre le ligand et les cellules, la formation de tels complexes indiquant la présence et/ou la quantité de lymphocyte T suppresseurs au sein de la population cellulaire.
- 30

16. Méthode de production d'une composition pharmaceutique, comprenant :
- (a) l'obtention d'un échantillon biologique comprenant des lymphocytes T humains,
 - 5 (b) la sélection des lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1 au sein de cet échantillon biologique, et
 - (c) le conditionnement desdits lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1 dans un adjuvant ou un milieu acceptable sur le plan pharmaceutique.
- 10 17. Méthode de production d'une composition pharmaceutique, comprenant :
- (a) l'obtention d'un échantillon biologique comprenant des lymphocytes T humains,
 - (b) la déplétion des lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1 au sein de cet échantillon biologique, et
 - 15 (c) le conditionnement desdits lymphocytes T obtenus n'exprimant pas l'antigène THY-1 dans un adjuvant ou un milieu acceptable sur le plan pharmaceutique.
- 20 18. Utilisation d'un ligand spécifique de l'antigène THY-1 pour sélectionner, identifier, trier ou préparer, in vitro ou ex vivo, des lymphocytes T suppresseurs humains.
- 25 19. Utilisation d'un ligand spécifique de l'antigène THY-1 pour préparer une composition diagnostique destinée à sélectionner, identifier ou quantifier in vivo des lymphocytes T suppresseurs humains.
- 30 20. Utilisation d'un ligand spécifique de l'antigène THY-1 pour préparer une composition thérapeutique destinée à modifier, stimuler ou supprimer in vivo des lymphocytes T suppresseurs humains.
21. Lymphocyte T humain isolé, caractérisé en ce qu'il présente une activité suppressive et en ce qu'il exprime les marqueurs CD8 ou CD4 et THY-1.

22. Composition cellulaire comprenant au moins, 50, 60, 70, 80, 85, 90 ou 95% de cellules T humaines CD8+THY-1+ ou CD4+THY-1+.
- 5 23. Lymphocyte T selon la revendication 21, caractérisé en ce qu'il est modifié génétiquement à l'aide d'un vecteur viral.
24. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un lymphocyte T suppresseur selon l'une des revendications 21 à 23 et un adjuvant
10 ou un milieu acceptable sur le plan pharmaceutique.
25. Utilisation d'un lymphocyte T ou d'une population de lymphocytes T selon l'une des revendications 21 à 23 pour la préparation d'une composition destinée à la mise en œuvre d'une méthode thérapeutique.
15
26. Utilisation selon la revendication 25, caractérisée en ce que la composition est destinée à être utilisée comme vaccin.
27. Utilisation selon la revendication 25 pour la préparation d'une composition
20 destinée au traitement d'une tumeur, d'une maladie auto-immune, d'une allergie, d'une maladie du greffon contre l'hôte, d'une maladie inflammatoire, d'un diabète de type I, d'une infection virale ou bactérienne, à la reconstitution immune ou à l'induction d'une tolérance en cas de transplantation de cellules souches, tissus ou organe chez un mammifère.
- 25
28. Kit pour isoler ou caractériser des lymphocytes T suppresseurs, humains comprenant un ligand spécifique de THY-1, placé en solution ou sur un support, ainsi que, éventuellement, des réactifs pour la détection du ligand.
30

1/10

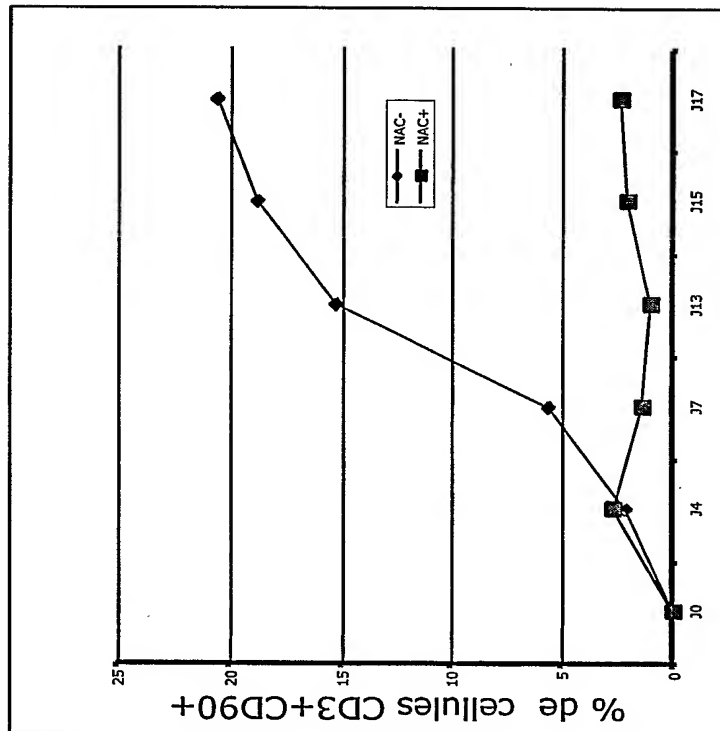
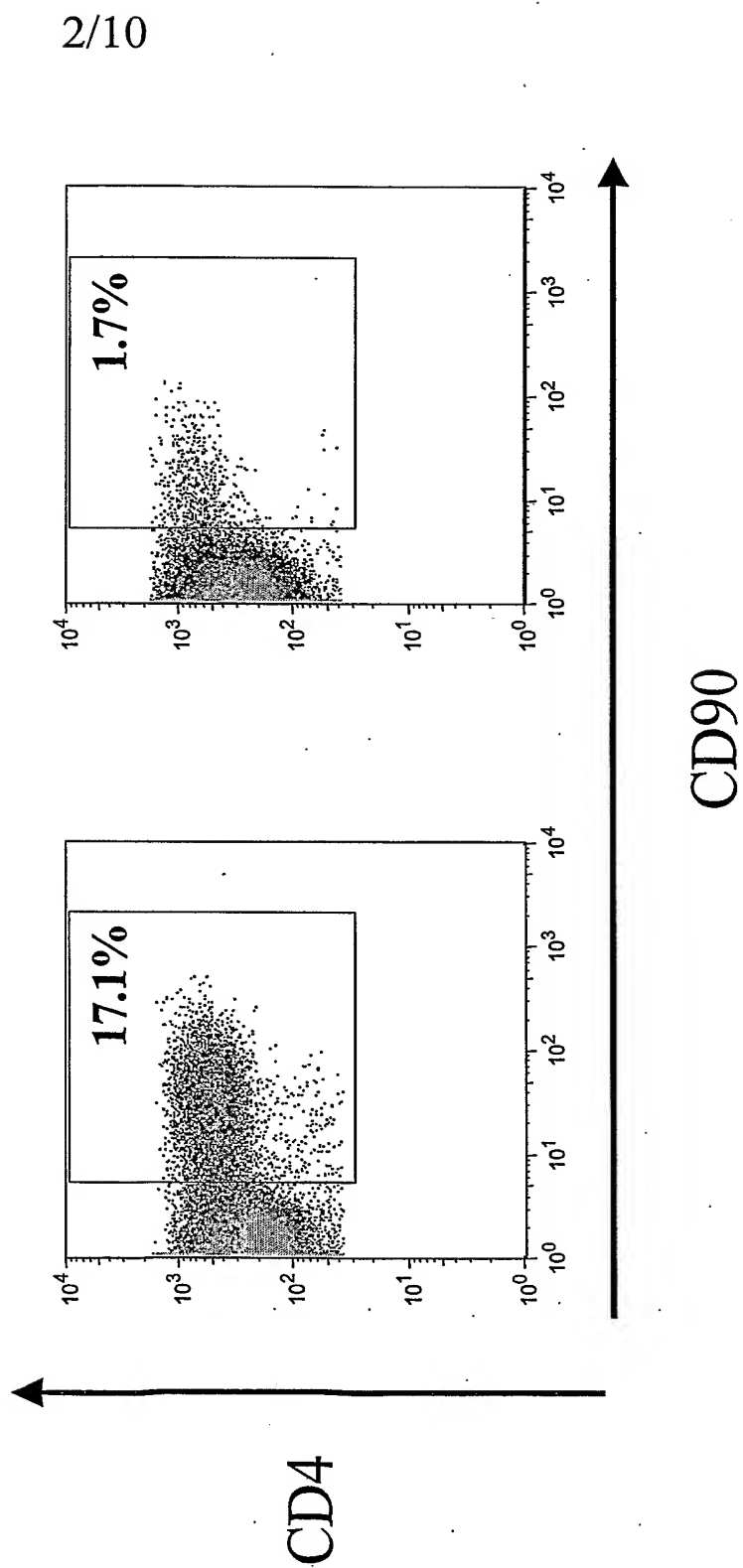


Figure 1

Figure 2

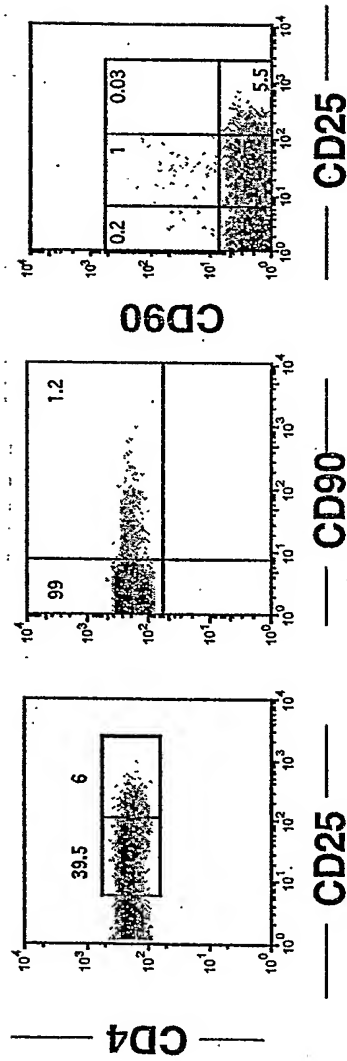
DC intersticielles DC Langerhansiennes



3/10

Figure 3

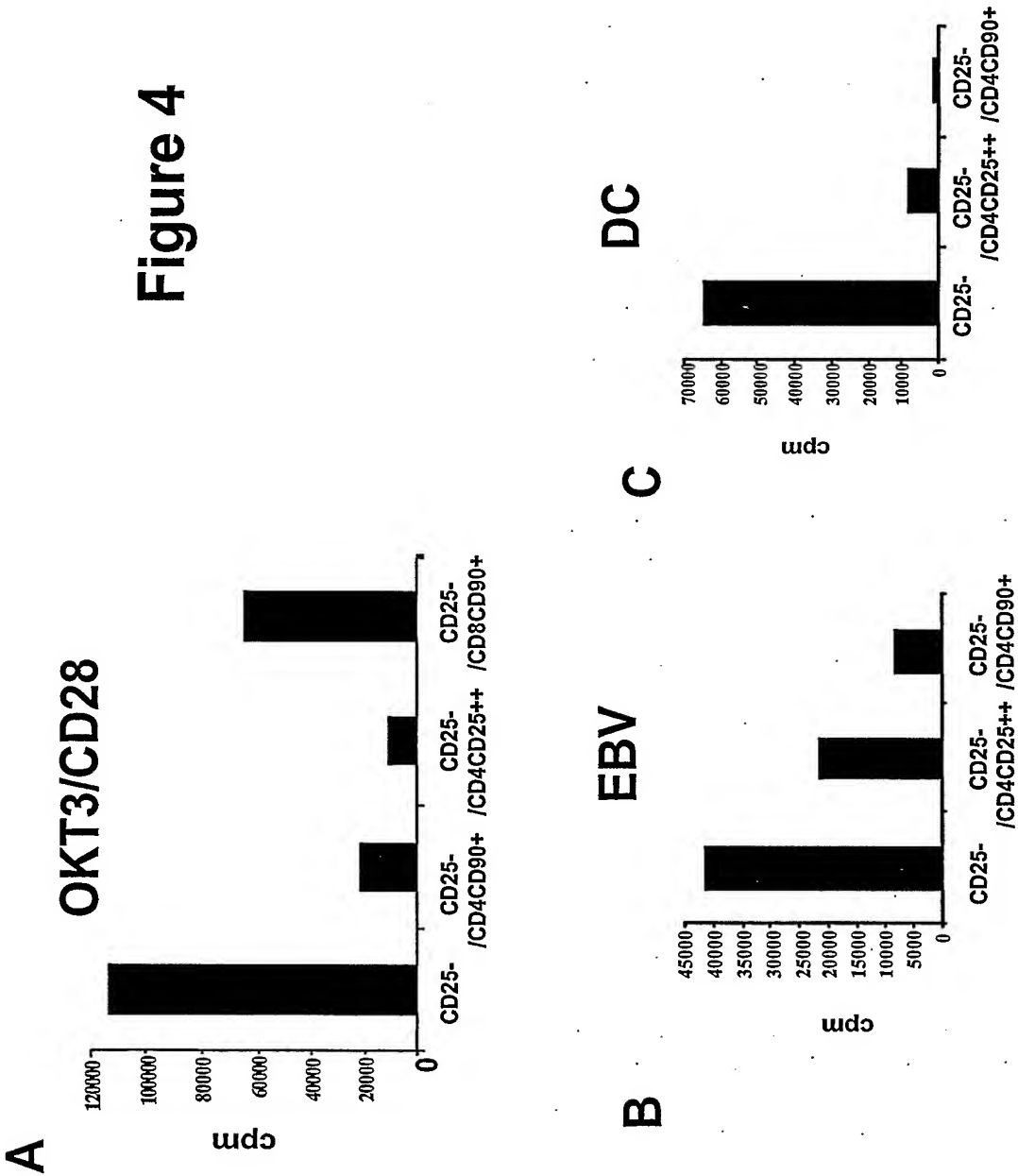
A



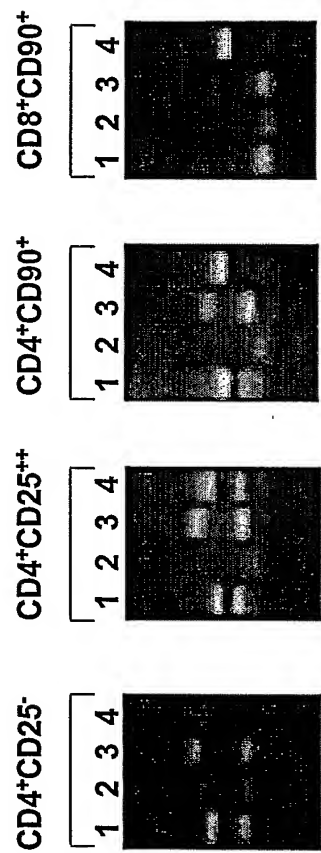
B



Figure 4



5/10



- 1 : CD4
- 2 : IL-10
- 3 : CTLA-4
- 4 : FoxP3

Figure 5

6/10

Figure 6

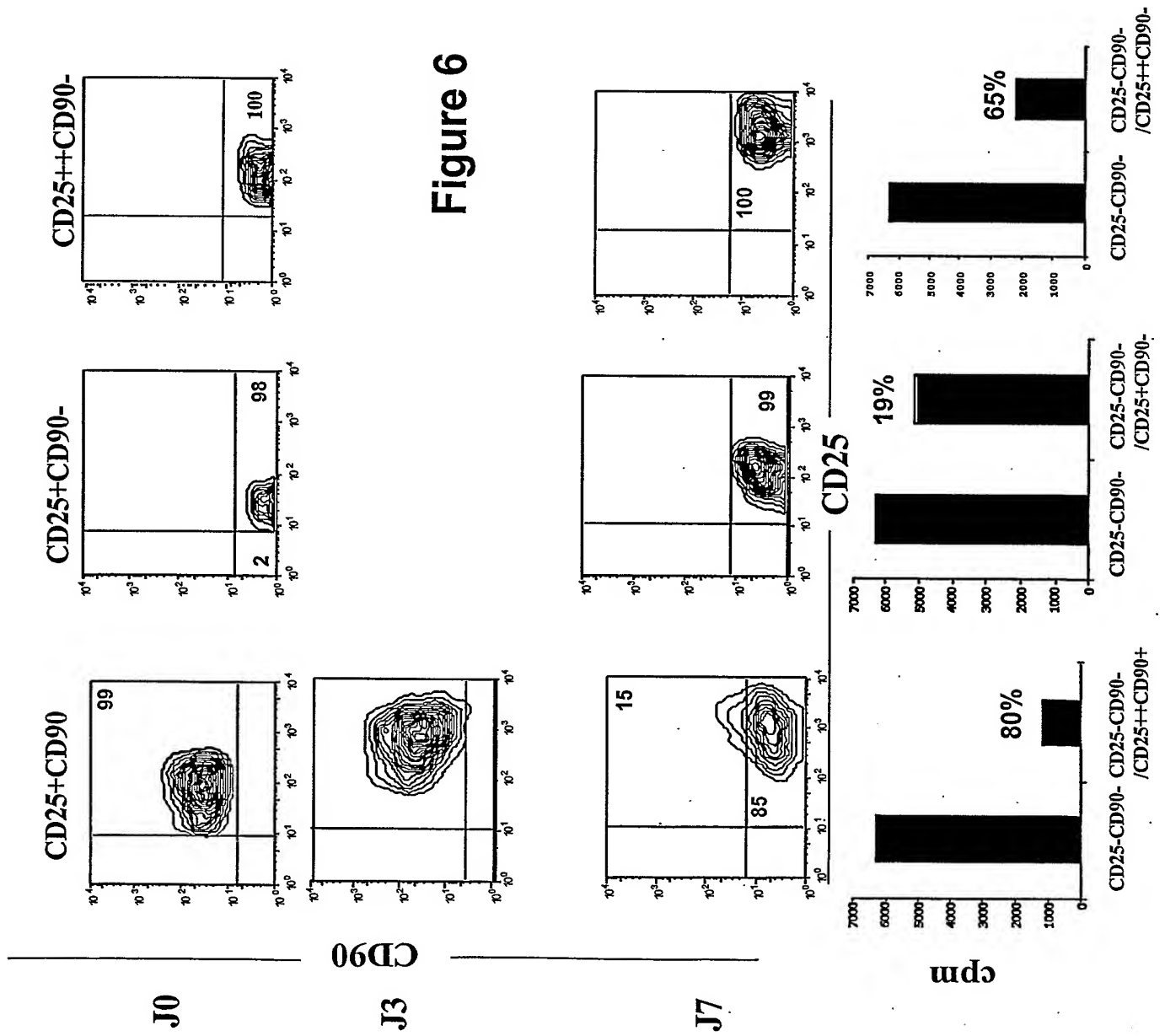


Figure 7

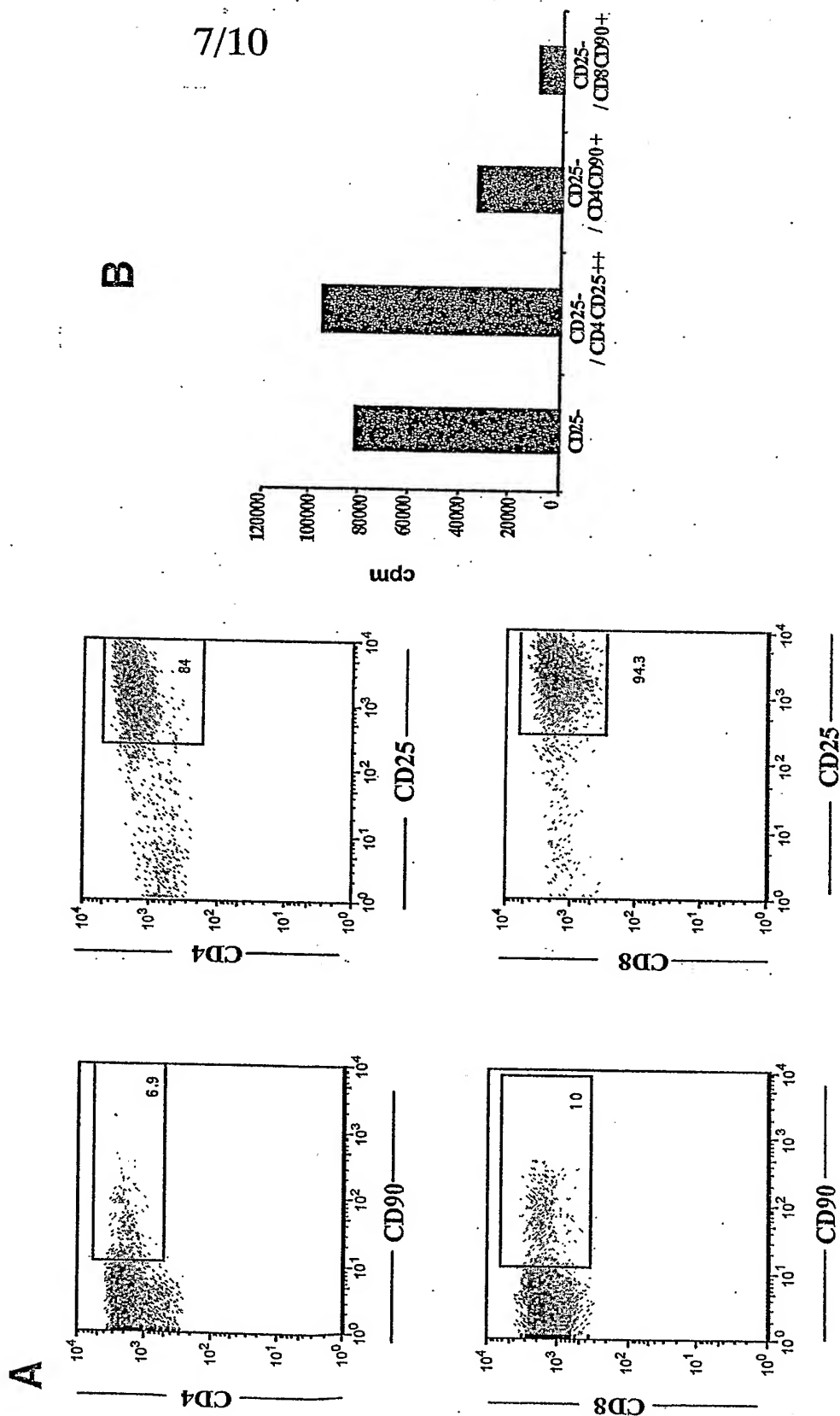
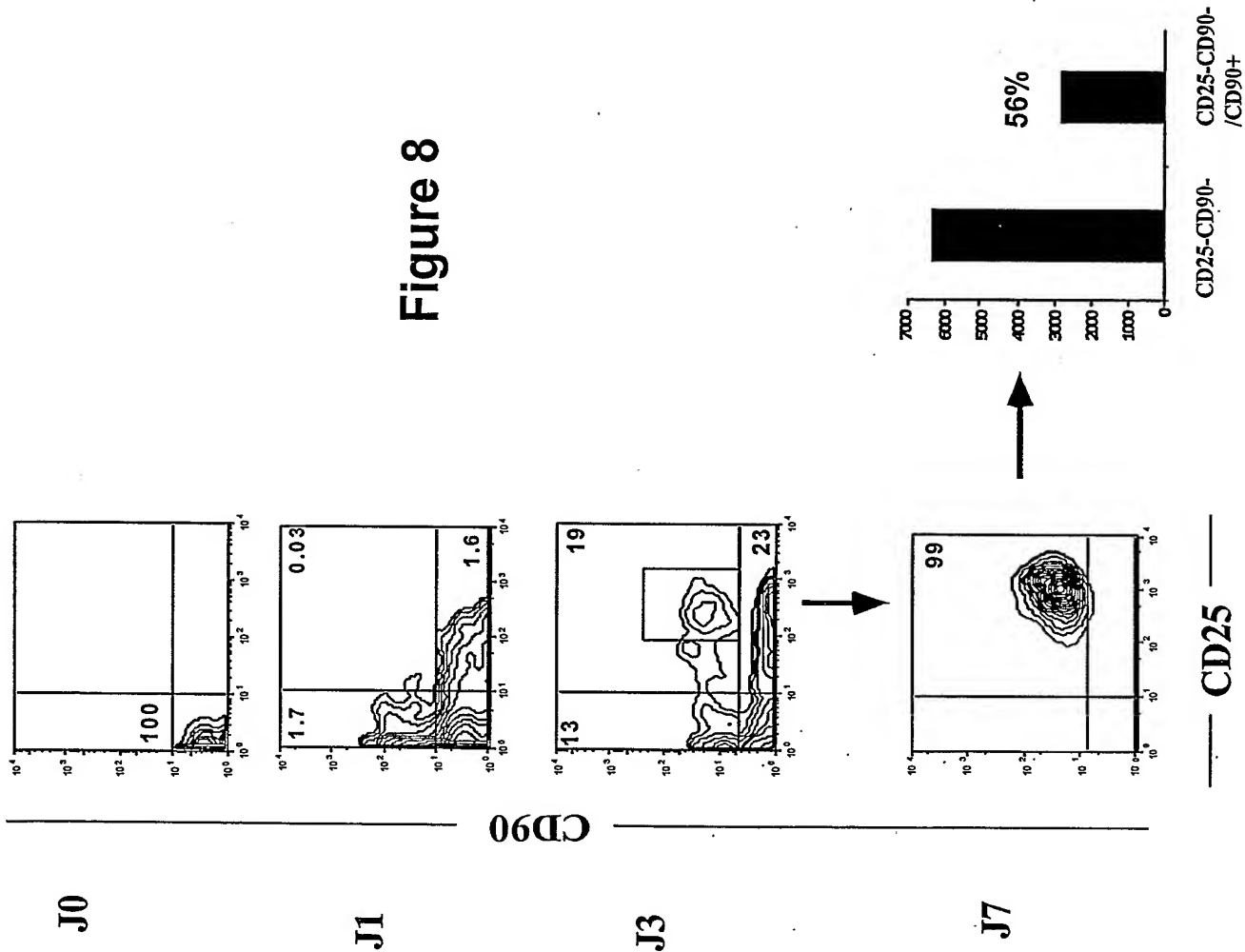


Figure 8



9/10

Figure 9

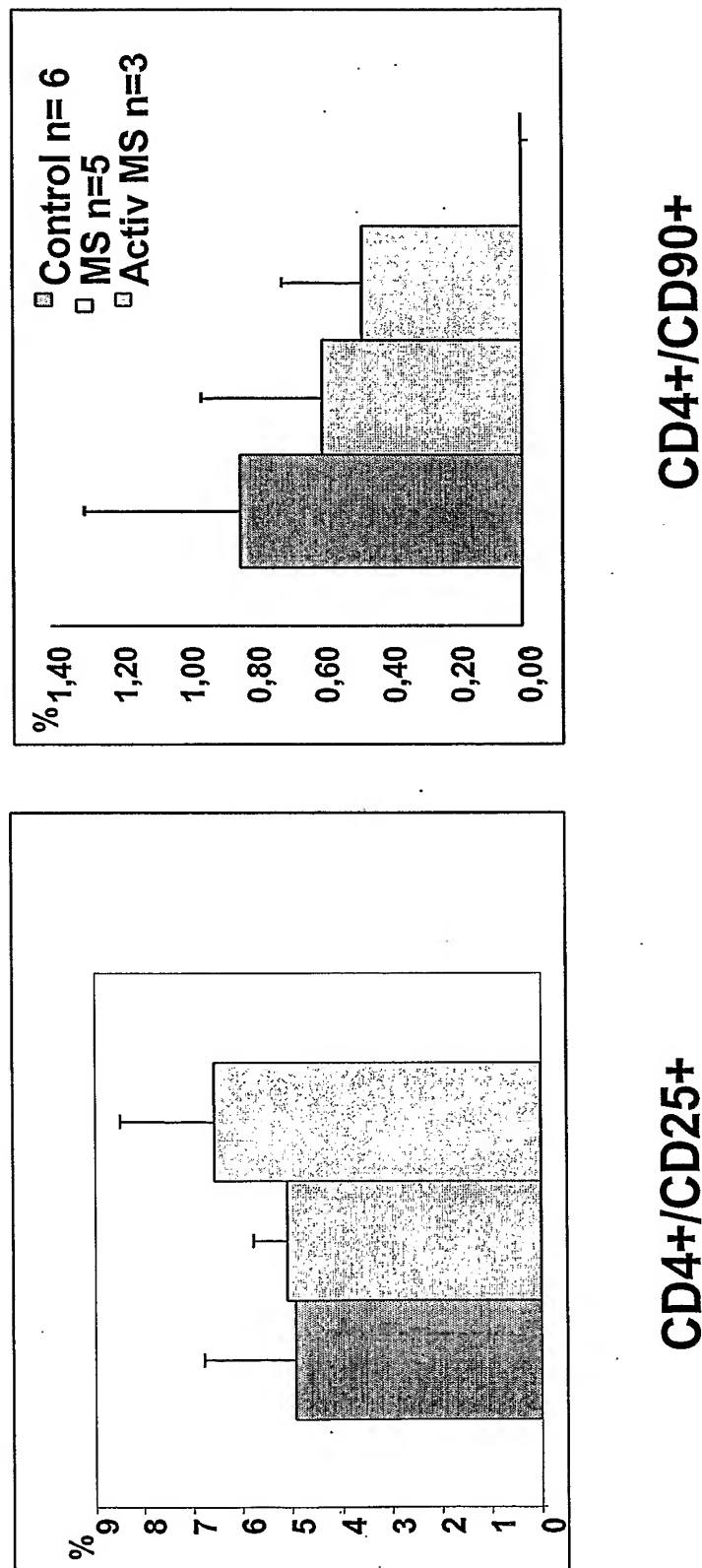
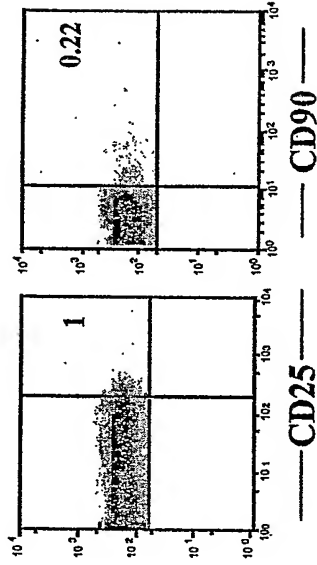


Figure 10

10/10

Patient IPEX



Donneur sain

